UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON IMIPRAMIN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WILHELM FRIEDRICH SCHOCKER

aus Tettnang

1979

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON IMIPRAMIN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WILHELM FRIEDRICH SCHOCKER

aus Tettnang

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung :	9. November 1979
Dekan :	Prof.Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter :	Prof.Dr. J.E. Schultz
2. Berichterstatter :	Prof.Dr. E. Reinhard

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden unter Leitung von Herrn Prof.Dr. J.E. Schultz am Institut für Toxikologie und am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof.Dr. J.E. Schultz danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Herrn M. Türck danke ich für die stete Bereitschaft zur Zusammenarbeit.

Meinen Eltern

und

Susanne

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. ABKÜRZUNGEN	1
2. EINLEITUNG	2
3. MATERIAL UND METHODEN	7
3. 1. Chemikalien	7
3. 1.1. Lösungen	8
3. 2. Geräte	9
3. 3. Tiere	11
3. 4. Vorbehandlung der Tiere	11
3. 5. Präparation und Inkubation der Gehirnschnitte	13
3. 6. Säulenchromatographische Reinigung der cAMP-haltigen Probe	16
3. 7. Bestimmung der Ausbeute	17
3. 8. Quantitative Bestimmung von cAMP	18
3. 8.1. Prinzip	18
3. 8.2. Gilman-Test	19
3. 9. Proteinbestimmung	22
3. 9.1. Biuret-Methode (modifiziert nach 28,29)	23
3. 9.2. Methode nach Lowry (30)	24
3.10. Isolierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase	24
3.10.1. Charakterisierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase	28

Seite

3.11. ^{3}H-Desmethylimipramin-Präparation 31

3.12. Bestimmung der Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin in Cortex und Cerebellum 34

3.12.1. Prinzip 35

3.12.2. Extraktion 37

3.12.3. Chromatographie 38

3.13. Bestimmung der Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin und 60 min-Inkubation in Cortex und Cerebellum 42

3.13.1. Prinzip 42

3.13.2. Extraktion 42

3.13.3. Chromatographie 43

3.14. Bestimmung der Rückaufnahme von Dopamin und Noradrenalin in Schnitten von Cortex und Cerebellum 43

3.14.1. Prinzip 43

3.14.2. Inkubation 44

3.15. Messung der motorischen Aktivität 45

3.16. Bestimmung der Dopamin- und Noradrenalin-Spiegel in Cortex und Striatum 47

3.16.1. Prinzip 47

3.16.2. Extraktion 48

3.16.3. Oxidation 49

3.17. Auswertung der Versuchsergebnisse 51

Seite

4. ERGEBNISSE 52

4. 1. cAMP-Bildung in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex 52

4. 2. Noradrenalin-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit Imipramin in Cerebellum und Striatum 54

4. 2.1. cAMP-Bildung in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum 55

4. 2.2. Dopamin(Noradrenalin)-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit Imipramin im Striatum 57

4. 3. Reversibilität der Noradrenalin-stimulierten cAMP-Bildung nach Ende der Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex 58

4. 4. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin in Cortex und Cerebellum 62

4. 4.1. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex 63

4. 4.2. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin und 60 min-Inkubation in Cortex und Cerebellum 66

Seite

4. 5. Rückaufnahme von Noradrenalin(Dopamin) in das präsynaptische Axon von Cortex, Cerebellum und Striatum nach Vorbehandlung mit Imipramin 69

4. 5.1. Rückaufnahme von Dopamin und Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin im Striatum 70

4. 5.2. Rückaufnahme von Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex 72

4. 5.3. Rückaufnahme von Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum 75

4. 5.4. Rückaufnahme von Noradrenalin in Abhängigkeit der Imipramin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex 77

4. 5.5. Rückaufnahme von Noradrenalin in Abhängigkeit der Imipramin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum 80

4. 5.6. Kinetik der Rückaufnahme von Noradrenalin in Cortex-Schnitten von unbehandelten und mit Imipramin behandelten Tieren 83

4. 6. Spontane motorische Aktivität nach Vorbehandlung mit Imipramin 87

Seite

4. 7. Noradrenalin(Dopamin)-stimulierte cAMP-Bildung und Noradrenalin(Dopamin)-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES in Cortex und Striatum 90

4. 7.1. Noradrenalin(Dopamin)-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES in Cortex und Striatum 92

4. 7.2. Noradrenalin(Dopamin)-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES in Cortex und Striatum 96

5. DISKUSSION 99

5. 1. Noradrenalin-stimulierte cAMP-Bildung 99

5. 2. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel 102

5. 3. Rückaufnahme 103

5. 4. Motorische Aktivität 107

5. 5. Noradrenalin-stimulierte cAMP-Bildung und Noradrenalin-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES 107

6. ZUSAMMENFASSUNG 112

7. LITERATURVERZEICHNIS 116

1. ABKÜRZUNGEN

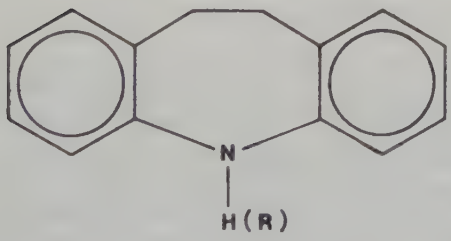
AMPT	α-Methyl-p-Tyrosin
BSA	Rinder-Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3´,5´-monophosphat
DA	Dopamin
DMI	Desmethylimipramin
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
IMI	Imipramin
IBMX	1-Methyl-3-Isobutyl-Xanthin
i.p.	intraperitoneal
LSC	Flüssig - Scintillationszählung
MeOH	Methanol
N	Anzahl der Tiere
NA	L - Noradrenalin
n.d.	nicht nachweisbar
n.s.	nicht signifikant
2 P	Wahrscheinlichkeit bei 2-seitiger Fragestellung
PDE	Phosphodiesterase
p.o.	peroral
PPO	2,5-Diphenyl-Oxazol
r	Korrelationskoeffizient
RES	Reserpin
SDS	Natrium-dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

2. EINLEITUNG

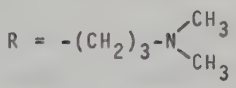
Auf der Suche nach neuen Präparaten mit Antihistamin-Wirkung wurde in den vierziger- und fünfziger Jahren bei einer Reihe von basisch substituierten Phenothiazin-derivaten der anti-psychotische Charakter entdeckt.

Die GEIGY-AG zog daraufhin das vor 80 Jahren von Thiele und Holzinger (1) erstmals synthetisierte IMINODIBENZYL (nach der Nomenklatur von Patterson und Capell (2) : 10,11-Dihydro-5H-dibenz(b,f)azepin - Abb. 1) als Grundkörper für weitere Molekül-variationen heran.

Abb. 1 : IMINODIBENZYL



IMIPRAMIN :



Das N-Dimethylaminopropyl-derivat IMIPRAMIN - zur Prüfung auf eine sedativ-hypnotische oder eine antipsychotische Wirkung von GEIGY zur Verfügung gestellt - erwies sich statt-dessen im klinischen Test als potentes Antidepressivum (3,4).

1959 - 3 Jahre nach der Entdeckung der antidepressiven Wirkung - beschrieben Domenjoz et al. (5) in einer umfassenden Arbeit den Antagonismus gegenüber Reserpin. Andere Autoren

deuteten den Reserpin-Antagonismus als eine Verstärkung zentraler Katecholamin-Wirkungen. Im selben Jahr beschreibt Sigg (6) eine „Potenzierung peripherer sympathischer Funktionen". Schaeppi (7) vermutete eine „Hemmung eines Noradrenalin-inaktivierenden Enzymsystems" (nicht MAO!).

Eine befriedigendere Erklärung der Katecholamin-Potenzierung ergaben aber erst Untersuchungen von Axelrod et al. (8,9 sowie 10,11,12), in denen eine Blockierung der Rückaufnahme von in den synaptischen Spalt ausgeschüttetem Noradrenalin in die präsynaptischen Gewebsspeicher gezeigt wurde. Durch diesen Effekt wird die Konzentration an wirksamem Noradrenalin am postsynaptischen Rezeptor erhöht. Fuxe et al. (13) konnten auch histochemisch die Rückaufnahme-Hemmung nachweisen.

Klinische Untersuchungen von Schildkraut et al. (14) machten einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Katecholamin-Haushalt und depressiven Erscheinungen wahrscheinlich. Während der Behandlung mit IMIPRAMIN fanden sie bei depressiven Patienten im Urin eine Abnahme von Vanillin-Mandelsäure, dem Endprodukt des Noradrenalin-Stoffwechsels. Die Ausscheidung von Normetanephrin war zwar unabhängig von der Zufuhr von IMIPRAMIN, eine Besserung der depressiven Symptome war aber von einer erhöhten Ausscheidung von Normetanephrin begleitet.

Schildkraut's Hypothese („the catecholamine hypothesis of affective disorders" - 15,16) vom relativen Defizit an Noradrenalin bei Depressionen konnte aber bis heute nicht weiter erhärtet werden.

Ende der sechziger Jahre ist zusätzlich das Interesse an Serotonin als möglichem Mediator an der klinischen Wirkung von IMIPRAMIN stärker in den Vordergrund getreten, obwohl durch die umfangreichen Arbeiten von Brodie et al. (17,18) über die Serotonin-Freisetzung aus dem Gehirn durch Reserpin und über den Reserpin-Antagonismus von IMIPRAMIN schon lange genügend Ansatzpunkte für solche Überlegungen vorhanden waren. Nach einer Hypothese von Carlsson et al. (12) sind bei der antidepressiven Wirkung von IMIPRAMIN Katecholamine für die Antriebssteigerung und Serotonin für die Stimmungshebung von Bedeutung.

Maßgebliche Forscher sind heute der Meinung, daß Veränderungen im Metabolismus der biogenen Amine nicht allein für die komplexen Phänomene der normalen und pathologischen Affektivität verantwortlich gemacht werden können.

Eine hohe Aktivität der Adenylatcyclase im Gehirn (19), sowie eine Erhöhung der cAMP-Spiegel in Gehirnschnitten durch Neurotransmitter (Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, Histamin) oder durch elektrische Stimulation oder depolarisierende Stoffe (Ouabain, Veratridin) machen eine Beteiligung von cAMP bei den vielfältigen Informationsübertragungen im Zentralnervensystem wahrscheinlich.

So war es klar, daß eine Reihe von Forschern der Frage nachgingen, ob „psychoaktive" Stoffe verschiedenster Natur möglicherweise mit dem durch Neurotransmitter regulierten cAMP-System in Zusammenhang stünden.

Einige mögliche Interaktionen solcher Stoffe mit bestimmten

Arealen in bzw. an Neuronen bzw. Synapsen sind - vereinfacht dargestellt:

- Stimulation oder Hemmung der Transmitter-Synthese-Enzyme
- Schädigung der Transmitter-Speicher
- Stimulation oder Hemmung der Freisetzung der Transmitter
- Direkte Stimulation oder Blockade des postsynaptischen Rezeptors
- Stimulation oder Hemmung der inaktivierenden Enzyme im Neuron bzw. synaptischen Spalt
- Veränderung der Membraneigenschaften und damit Stimulation oder Hemmung der Rückaufnahme.

Vetulani et al. (20) und unabhängig davon Schultz (21) konnten zeigen, daß bei Applikation von DESMETHYL-IMIPRAMIN (10 mg/kg/Tag i.p.) bzw. IMIPRAMIN (20 mg/kg/Tag p.o.) über mehrere Tage der durch Noradrenalin stimulierte cAMP-Gehalt in Gehirnschnitten der Ratte auf etwa 50 % der Kontrollwerte abfiel. Die noradrenergen postsynaptischen Rezeptoren sind subsensitiv geworden. Da dieser Effekt erst nach längerer IMIPRAMIN-Applikation auftritt bzw. mit dem klinischen Wirkungseintritt von IMIPRAMIN beim Menschen (im Mittel: Tag 8 (22)) übereinstimmt, scheint hier ein möglicherweise wichtiger Schritt in der weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Antidepressiva gesetzt worden zu sein.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Wirkungen einer Langzeitbehandlung mit IMIPRAMIN in verschiedenen Arealen des Rattengehirns. Insbesondere wurde folgenden Fragen nachgegangen :

1. Bleiben die Rezeptoren auch nach Absetzen der Droge subsensitiv bzw. ist die Subsensitivität reversibel ?

2. Sind Veränderungen im Wirkstoff-Spiegel im Gehirn (Kumulation?) für die antidepressive Wirkung mitverantwortlich ?

3. Verändert sich die Rückaufnahme(kinetik) bei Langzeitbehandlung ?

4. Welche Aufschlüsse bringt eine Vorbehandlung der Tiere mit IMIPRAMIN, α-Methyl-p-Tyrosin, Reserpin und deren Kombinationen ?

5. Wie verhalten sich die Transmitter-Spiegel bei diesen Versuchen ?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Chemikalien

cyclisches Adenosin-3´,5´-monophosphat	Boehringer, Mannheim
Lubrol-PX	ICI, Frankfurt
Dowex 50 WX 4 (8), 200-400 mesh	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	
L-Noradrenalin-bitartrat	
DEAE-Cellulose SS	
Chloramphenicol	
Siliconlösung „Serva"	
Natrium-dodecylsulfat	
Triton X-100(405)	
Brij 30(35,56,58)	
α-Methyl-p-Tyrosin	Sigma, St. Louis (USA)
Dopamin-HCl	
^{3}H- cAMP 32 Ci/mMol	Amersham Buchler,
^{14}C- cAMP 45 mCi/mMol	Braunschweig
^{3}H-DL- NA 9 Ci/mMol	
^{3}H-L- NA 13,1 Ci/mMol	
15 Ci/mMol	
^{14}C-DL-NA 48,3 mCi/mMol	
^{3}H- DA 5 Ci/mMol	
^{14}C- DA 48,2 mCi/mMol	

^{3}H-	IMI	21	Ci/mMol	Amersham Buchler,
		22	Ci/mMol	Braunschweig
^{14}C-	IMI	10,5	Ci/mMol	

1-Methyl-3-Isobutyl-Xanthin	EGA-Chemie, Steinheim
Rinder-Serumalbumin	Behringwerke, Marburg
Imipramin-HCl Desmethylimipramin-HCl	Ciba-Geigy AG, Basel
Äthylenglykolmonomethyläther	Riedel-de Haën AG
Cellulose CM 52 microgranular, preswollen	Whatman
Reserpin-Base (BCP-Qualität)	C. Roth, Karlsruhe
alle anderen Substanzen	Merck, Darmstadt

3.1.1. Lösungen

1) Krebs-Ringer-Medium :	NaCl	122 mM
	D-Glucose	10 mM
	$NaHCO_3$	25 mM
	KCl	3 mM
	KH_2PO_4	0,4 mM
	$MgSO_4$	1,2 mM
	$CaCl_2$	1,3 mM
	in demin. Wasser	

2) Biuret-Reagenz :	1. demin. Wasser	800	ml
	2. $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	4,7	g
	3. K-Na-tartrat	9,0	g
	4. NaOH 1 N	200	ml
	5. KJ	5,0	g
3) Alkalisches Cu-Reagenz	$CuSO_4$ 1 %	1	ml
für Protein-Bestimmung	K-Na-tartrat 2,7 %	1	ml
nach Lowry :	Na_2CO_3 2 % in		
	0,1 N NaOH	100	ml
4) BRAY-Scintillator :	Äthylenglykol	40	ml
(modifiziert nach	Methanol	200	ml
(23))	Dioxan	1760	ml
	PPO	7,6	g
	Naphthalin	120,0	g
5) Toluol-Scintillator :	Toluol	2000	ml
	Äthylenglykolmono-		
	methyläther	730	ml
	PPO	10,92	g

3.2. Geräte

Dilumatik	Braun, Melsungen

Gewebeschneider (McIlwain Tissue Chopper)	The Mickle Laboratory Engineering Comp., England
Photometer PM 6 mit Drucker XP 2, DC-Spektralphotometer KM 3 mit Anzeigegerät PMQ II	C. Zeiss, Oberkochen
Schreiber Servogor S linear Typ RE 541	Metrawatt, Nürnberg
Spektralfluorimeter Fluoripoint FC 100	Baird-Atomic
Flüssig-Scintillationszähler Isocap 300	Searle, Heusenstamm
Zentrifuge Sorvall RC-5	Du Pont de Nemours, Bad Nauheim
Zentrifuge Variofuge S	Heraeus-Christ, Osterode
Motilitäts-Meßgerät (electronic activity monitor)	Stoelting Comp., Chicago (USA)
Celluloseacetat-Membranfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Programmierbarer Rechner HP 65	Hewlett-Packard

3.3. Tiere

Sprague Dawley Ratten ♂ Ivanovas, Kisslegg

Die Tiere erhielten Wasser und Trockenfutter (Altromin-Standarddiät) ad libitum.

3.4. Vorbehandlung der Tiere

Die Applikation der Lösungen erfolgte mit einer Schlundsonde (oral). Sie war in der Regel zwischen 8 - 11 Uhr vormittags.
Die Kontroll-Tiere erhielten identische Lösungen ohne Wirkstoff.

a) mit Imipramin (IMI)

Schema 1	1. - 3.	Tag	50 mg/kg/Tag
	4. - 8. (9.)	Tag	30 mg/kg/Tag
Schema 2	1. - 9.	Tag	30 mg/kg/Tag

Wenn nicht besonders erwähnt, wurden die Tiere nach Schema 1 vorbehandelt !

Lösung : 6 (10) mg IMI-HCl/ml demin. Wasser

b) mit Imipramin und Chloramphenicol

	1. - 3.	Tag	IMI	50 mg/kg/Tag
	4. - 8.	Tag	"	30 mg/kg/Tag
9. Tag	7^{30}	IMI 30 mg/kg + Chloramph.		100 mg/kg
	14^{30}	-	"	"
	22^{00}	-	"	"
10. - 14. Tag	7^{30}	-	"	"
	19^{30}	-	"	"

Suspension in 3,5 %-iger Gelatinelösung : 20 mg Chloramphenicol/ml

c) mit α-Methyl-p-Tyrosin (AMPT)

1. - 9.	Tag	200 mg/kg/Tag

Suspension in 3,5 %-iger Gelatinelösung : 40 mg AMPT/ml

d) mit Reserpin (RES)

1. - 9.	Tag	1 mg/kg/Tag

Lösung : 0,2 mg Base/ml 0,4 % Ascorbinsäure (24)

Bei Synchron-Behandlungen mit 2 Wirkstoffen wurden entsprechende Kombi-Lösungen verwendet.
Das Gewicht der Tiere - nach Vorbehandlung - lag im Durchschnitt zwischen 180 - 250 g. Die Decapitation der Tiere fand etwa 24 h (Ausnahme: 60 min-Experimente) nach der letzten Dosierung statt.

3.5. Präparation und Inkubation der Gehirnschnitte

Die Tiere wurden nach Wägen durch Decapitation getötet, die Schädeldecke eröffnet und das Gehirn in eiskaltes Krebs-Ringer-Medium gelegt. Für die Untersuchungen wurden Cortex, Cerebellum und Striatum verwendet.

Die Präparation der Gehirnteile wurde auf einer eisgekühlten Aluminium-Folie mit Hilfe einer Rasierklinge und zweier Iris-Pinzetten durchgeführt.

Bei den Experimenten mit Cortex oder/und Cerebellum wurde das Kleinhirn abgetrennt, der übrige Teil durch einen Medians agittal-Schnitt halbiert und die Großhirnrinde von innen heraus durch Abheben verschiedener Gehirnstrukturen und Abziehen der weißen, myelinreichen Corpus callosum-Schicht präpariert. Bei Verwendung des Striatum wurde die von Glowinski und Iversen (25) beschriebene Technik gewählt :

Nach Abtrennung des Kleinhirns wurde der Rest von unten durch einen Frontalschnitt in Höhe des Chiasma opticum geteilt. Aus dem kleineren, vorderen Teil wurde das Striatum sorgfältig freigelegt. Sofort anschließend wurden die Gehirnteile getrennt mit einem Gewebeschneider (McIlwain Tissue Chopper) in Schnitte von 260 µm Dicke zerteilt. Die Zeit zwischen dem Töten der Tiere und dem Beginn der ersten Inkubation betrug 8 - 13 min.

Die Schnitte wurden mit einem Spatel in ein Becherglas mit etwa 25 ml Krebs-Ringer-Medium überführt und 10 min inkubiert. Diese und alle folgenden Inkubationen wurden im Wasserbad bei 37 $\pm$ 1^{o} C und Carbogen-Begasung (95 % O_2, 5 % CO_2) durchgeführt.

Nach dem Absaugen des Mediums wurde das Gewebe zur Trennung aneinanderhaftender Schnitte 3 x mit einer abgeschnittenen Pasteur-Pipette (Durchmesser der Öffnung etwa 2 mm) aufgezogen, 1 - 2 x (je nach Trübung des Mediums) mit 50 ml frischem, warmem Puffer gewaschen und nach Zugabe von etwa 30 ml Puffer 40 min weiterinkubiert. Nach Absaugen des Mediums und 1 - 2-maligem Waschen der Schnitte wurde für weitere 10 min inkubiert. Die folgende Stimulationsperiode wurde für Cortex (und Cerebellum) und Striatum nach verschiedenen Methoden durchgeführt :

a) Cortex, Cerebellum

Die Schnitte wurden nach Absaugen des Mediums mit der abgeschnittenen Pasteur-Pipette auf kleine Bechergläser verteilt, die 9,5 ml Krebs-Ringer-Medium und das zur Stimulierung der cAMP-Bildung vorgesehene Noradrenalin (Kontrollen: demin. Wasser) enthielten.
Das Endvolumen betrug 10 ml, die Endkonzentration 10^{-4} M bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-4} M bei den Dosis-Wirkungs-Kurven.
Die Inkubationszeit war 10 min.

b) Striatum

Die Inkubation erfolgte nach Forn et al. (26).
Die Schnitte wurden auf 10 ml-Zentrifugengläser verteilt, die nach folgendem Schema zuvor beschickt worden waren :

	IBMX ml	Ascorbinsäure ml	DA ml	NA ml
Kontrolle	1,9	0,1	-	-
Dopamin	1,9	-	0,1	-
Noradrenalin	1,9	-	-	0,1
End-Konz. M	10^{-3}	$6 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$3 \cdot 10^{-4}$

Die Lösungen wurden mit Krebs-Ringer-Medium (und Ascorbinsäure) hergestellt.

Nach kurzzeitigem, kräftigem Begasen mit Carbogen wurden die Zentrifugengläser mit Parafilm verschlossen und im Wasserbad - in einem Ständer stehend - leicht hin- und herbewegt, um ein Absetzen der Schnitte zu verhindern.
Die Inkubationszeit war 15 min. Diese 10 - bzw. 15-minütigen Stimulationsperioden wurden wiederum nach verschiedenen Methoden gestoppt :

a) Cortex, Cerebellum

Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde das Krebs-Ringer-Medium auf einem Büchner-Trichter abgesaugt und die Schnitte in 3 ml-Glashomogenisatoren, die 1 ml

eiskalte 0,4 N Perchlorsäure und etwa 1 nCi ^{14}C-cAMP zur Bestimmung der Ausbeute enthielten, homogenisiert.

b) Striatum

Die Zentrifugengläser wurden geöffnet und mit einer Eppendorf-Pipette 1 ml eiskalte 0,4 N Perchlorsäure zugegeben. Nach Schütteln der Gläser wurde noch etwa 1 nCi ^{3}H-cAMP zugesetzt.

Der flockige Protein-Niederschlag wurde abzentrifugiert. Sediment und Überstand wurden getrennt weiterverarbeitet.

3.6. Säulenchromatographische Reinigung der cAMP-haltigen Probe

Der nach dem Zentrifugieren erhaltene Säureextrakt wurde je nach Herkunft (Cortex, Cerebellum oder Striatum) nach einem der folgenden Verfahren weiterbehandelt :

a) Cortex, Cerebellum

Der Perchlorsäure-Überstand wurde mit etwa 115 µl 3 M TRIS neutralisiert und auf eine Ionenaustauscher-Säule (Dowex 50 WX 4, 200-400 mesh - 40 x 6 mm) aufgetragen. Nach Einziehen der Probe wurde mit 2 ml Wasser gewaschen und das cAMP mit weiteren 2,5 ml

in 10 ml-Zentrifugengläser eluiert.

b) Striatum

Der saure Überstand (etwa ph 1) wurde mit etwa 110 µl 3 M TRIS neutralisiert und auf eine Ionenaustauscher-Säule - wie oben angegeben - gegeben. Gewaschen wurde mit 1 ml Wasser, eluiert mit 4 ml.

Nach Gebrauch wurden die Säulen mit 1 ml 1 N HCl regeneriert und vor Wiederverwendung mit etwa 30 ml Wasser bis zur Neutralität gewaschen. War nach etwa 10 Elutionen die Austauschkapazität der Säulen endgültig erschöpft (erkenntlich an der stark sinkenden Ausbeute), wurden neue Säulen verwendet.

Die neutralen Eluate wurden nach Einfrieren lyophilisiert und je nach Höhe des zu erwartenden cAMP-Gehalts in 0,3 - 1 ml Natriumacetat-Puffer (0,05 M, ph 4,0) aufgenommen.

3.7. Bestimmung der Ausbeute

Durch den oben beschriebenen Reinigungsschritt geht ein von Probe zu Probe unterschiedlicher Prozentsatz des zu bestimmenden cAMP verloren.
Um die Ausbeute des im Acetat-Puffer gelösten cAMP zu ermitteln, wurde - nach Schütteln der Zentrifugengläser - ein Aliquot (0,2 - 0,75 ml) in LSC-Gefäße pipettiert, mit 5 ml BRAY-Scintillator versetzt und im Flüssig-Scintilla-

tionszähler die Menge ^{14}C-cAMP (Striatum: ^{3}H-cAMP) im Vergleich zur ursprünglich zugesetzten Menge gemessen.
Die Ausbeuten lagen bei ^{14}C-cAMP zwischen 70 - 90 %, bei ^{3}H-cAMP zwischen 50 - 70 %.

3.8. Quantitative Bestimmung von cAMP

Die Bestimmung des cAMP-Gehaltes erfolgte mit der Isotopen-Verdünnungsmethode nach Gilman (27).

3.8.1. Prinzip

Es beruht auf der spezifischen Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase.
Wird eine Probe mit unbekanntem Gehalt an cAMP zusammen mit einer definierten Menge an ^{3}H-markiertem cAMP und cAMP-abhängiger Proteinkinase inkubiert, konkurrieren unmarkiertes und markiertes cAMP um die Bindung an die Untereinheit der Kinase. Dabei bildet sich ein (^{3}H-)cAMP-Protein-Komplex.
Ist die Konzentration von ^{3}H-cAMP gleich oder größer als die Sättigungskonzentration, wird immer dieselbe Menge ^{3}H-cAMP gebunden.
Enthält die Probe wenig (viel) cAMP, wird die Radioaktivität des Komplexes groß (klein) sein.

Die Isolierung des cAMP-Proteinkomplexes und seine Abtrennung von nicht-gebundenem cAMP erfolgt durch Absaugen des Inkubationsansatzes durch einen Celluloseacetat-Membranfilter, der - wie empirisch festgestellt wurde - den Komplex quantitativ durch Adsorption bindet.
An Hand von parallel inkubierten Eichkurven ist es möglich, den cAMP-Gehalt von Proben zu bestimmen.

3.8.2. Gilman-Test

In Einmal-Reagenzgläser (Polystyrol - Volumen 3,5 ml) wurden folgende Lösungen pipettiert :

a) Eichkurven	1.	0 - 25 µl demin. Wasser
	2.	20 µl „Mix" enthaltend 0,5 - 0,8 pMol ^{3}H-cAMP (32 Ci/mMol), 5 µl Natriumacetat-Puffer (0,5 M, ph 4,0), demin. Wasser ad 20 µl
	3.	0 - 15 µl cAMP-Standard (0,5 pMol/µl)
b) Proben	1.+2.	wie unter a)
	3.	5 (10) bzw. 10 (20) µl Probenlösung

Nach dem Abkühlen der Teströhrchen im Eisbad wurde zu jedem Gläschen dieselbe Menge an eisgekühlter Proteinkinase-Lösung zugegeben (2,6 - 4,3 µg Proteinkinase bzw. 6 - 10 µl einer Lösung von 0,43 mg Proteinkinase und 1 mg Rinder-Serumalbumin in 1 ml Phosphat-Puffer (5 mM, ph 7,0 - 2 mM EDTA)).

Die Inkubationsdauer betrug 12 - 15 h bei 0^{o} C. Danach wurden die Testansätze mit Hilfe einer halbautomatischen Filtrierapparatur (Dilumatik) mit 0,8 ml eiskaltem Kaliumphosphat-Puffer (20 mM, ph 6,0) verdünnt, das gesamte Volumen durch Celluloseacetat-Filter (Ø 18 mm, Porengröße 0,45 µm) abgesaugt, die Filter sofort anschließend mit etwa 4 ml obigem Phosphatpuffer gewaschen und in Scintillationsgefäße gelegt.

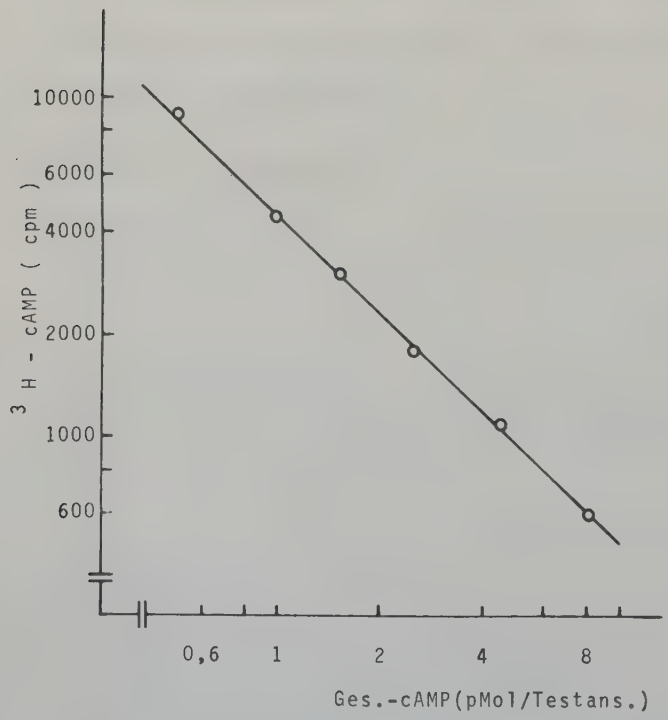
Nach dem Trocknen der Filterscheibchen im Trockenschrank (70^{o} C, 30 min) wurde 5 ml Toluol-Scintillator zugegeben und die Radioaktivität im Flüssig-Scintillationszähler bestimmt.

Bei jedem Test wurden mindestens 2 Eichkurven (je 6 - 8 Werte, 0 - 7,5 pMol zugesetztes unmarkiertes cAMP - siehe Abb. 2) parallel inkubiert, wobei die Inkubationsansätze der 1. Eichkurve vor, die der 2. nach den Probenröhrchen abfiltriert wurden, um mögliche, während des Filtrierens auftretende Änderungen in der Stabilität der cAMP-Protein-Komplexe erkennen zu können.

Die cpm-Werte der Eichkurven wurden auf doppeltlogarithmischem Papier gegen die cAMP-Gesamt-Konzentration (markiert + unmarkiert) aufgetragen.

Abb. 2 : Eichgerade zur cAMP-Bestimmung

6 µl Proteinkinase-Präparation (2,6 µg Proteinkinase und 6 µg Rinder-Serumalbumin in Kaliumphosphat-Puffer (5 mM, ph 7,0 - 2 mM EDTA) wurden mit 0,5 pMol ^{3}H-cAMP (32 Ci/mMol), 0 - 7,5 pMol unmarkiertem cAMP und 5 µl Natriumacetat-Puffer (0,5 M, ph 4,0) 12 h bei 0° C inkubiert



Zur Berechnung der unbekannten cAMP-Konzentration x der Proben wurde die Freundlichsche Adsorptionsisotherme herangezogen :

$$\log cpm = m \cdot \log x + Konst.$$

Die Werte für cpm erhält man aus dem Bindungstest, m und die Konstante aus der Standardkurve.

Die Berechnung der Eichgeraden und die Umrechnung der erhaltenen Ergebnisse von cpm in pMol cAMP/Incubationsansatz erfolgte mit Hilfe eines Computerprogrammes (Rechner HP 65). Mit den entsprechend 3.7. bestimmten Ausbeuten und den Proteinwerten (siehe 3.9.1. bzw. 3.9.2.) wurden die erhaltenen Ergebnisse in

pMol cAMP / mg Protein x 10(15)min

umgerechnet.

3.9. Proteinbestimmung

Der nach der Zentrifugation des Homogenats und dem Abheben des Überstandes verbleibende Protein-Niederschlag wurde mit 1 ml Natrium-desoxycholat-Lösung (2.5 % in 0.5 N NaOH -

Proteinbestimmung nach Lowry (siehe 3.9.2.) : 1 ml 1 N NaOH) versetzt, und die entstandene Lösung bzw. Suspension mit einer Pasteur-Pipette in ein Einmal-Reagenzglas (Polystyrol - Volumen 3,5 ml) überführt.

Der Homogenisator wurde mit etwa 500 µl Wasser nachgespült. Die vereinigten Lösungen wurden gewogen. Die mit Parafilm verschlossenen Röhrchen ließ man bei 0^{o} C bis zur Proteinbestimmung stehen.

In Abhängigkeit von der erwarteten Proteinmenge wurde die Proteinbestimmung nach einer von 2 Methoden durchgeführt. Bei Proteinmengen von vermutlich mehr als 2 mg wurde die Biuret-Methode, bei kleineren Mengen die Methode nach Lowry gewählt.

3.9.1. Biuret-Methode (modifiziert nach 28,29)

0,3 und 0,6 ml der Proteinlösung wurden mit Wasser auf 2,5 ml verdünnt, 2,5 ml Biuret-Reagenz (siehe 3.1.1.) zugegeben, gemischt, und 30 min später gegen einen Reagenzienleerwert im Photometer bei 546 nm gemessen. Mit den gemessenen Extinktionswerten $\Delta E_{0,3}$ und $\Delta E_{0,6}$, dem aus Eichkurven ermittelten Umrechnungsfaktor 16,5 und dem Gesamtvolumen G (Dichte der Lösung = 1) der Proteinlösung wurde die Proteinmenge in mg berechnet :

$$mg = \frac{(\Delta E_{0,3} + \Delta E_{0,6}) \times 16,5 \times G}{0,9}$$

3.9.2. Methode nach Lowry (30)

50 - 300 µl Proteinlösung wurden mit Wasser auf 500 µl ergänzt, 500 µl 1 N NaOH und 5 ml alkalisches Cu-Reagenz (siehe 3.1.1.) zugegeben und mindestens 10 min stehen gelassen. Nach der Zugabe von 0,5 ml Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (vor Gebrauch 1 + 1 mit Wasser verdünnt) wurde sofort gut gemischt. Nach 30 min wurde die Extinktion bei 720 nm im Photometer gegen einen Reagenzienleerwert gemessen.

An Hand einer parallel pipettierten Eichkurve (Standard: Rinder-Serumalbumin) wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes (Rechner HP 65) der Proteingehalt der Proben berechnet. Die Eichkurve war erfahrungsgemäß bis zu einer Proteinkonzentration von 100 µg/Inkubationsansatz linear.

3.10. Isolierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Die Isolierung wurde in Zusammenarbeit mit U. Andrae (31) - leicht modifiziert - nach (32) durchgeführt.
Alle Operationen fanden bei + 4^{o} C statt. Alle verwendeten Puffer enthielten 2 mM EDTA.

Schritt 1 : Herstellung des Rohextraktes

2100 g frischer Rinderhalsmuskel wurden von Fett und Sehnen befreit, in kleine Stücke ge-

schnitten und in 200 g-Portionen im 3-fachen Volumen EDTA (4 mM, ph 7,0) im Star-Mix bei maximaler Rotorgeschwindigkeit 2 min homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Mull gepreßt und das Filtrat (6,25 l) bei 27 000 g 30 min bei + 4° C zentrifugiert (Sorvall RC-5, Rotor GSA).

Schritt 2 : Säurefällung

Der dunkelrote Überstand (5,61 l) wurde durch Zugabe von insgesamt 75 ml 1 N Essigsäure unter Rühren auf ph 4,8 eingestellt. Nach 50 min Rühren wurde abzentrifugiert (27 000 g, 30 min). Der klare Überstand (5,42 l) wurde durch Zugabe von 780 ml Kaliumphosphat-Puffer (1 M, ph 7,2) auf ph 6,65 eingestellt.

Schritt 3 : Ammoniumsulfat-Fraktionierung

In die Lösung wurden langsam unter stetigem Rühren insgesamt 2015 g Ammoniumsulfat (≙ 42,8 % Sättigung) gegeben. Nach 45 min Rühren wurde der entstandene Niederschlag durch Zentrifugation (16 000 g, 20 min) gesammelt und in 375 ml (≙ 6 % des Rohextrakt-Volumens) Kaliumphosphat-Puffer (5 mM, ph 7,0) gelöst. Die Proteinlösung wurde gegen insgesamt 22 l desselben Puffers 20 h lang dialysiert (3-maliger Pufferwechsel).

In Abänderung der Originalvorschrift wurde anschließend nicht zentrifugiert.

Schritt 4 : DEAE-Cellulose-Chromatographie

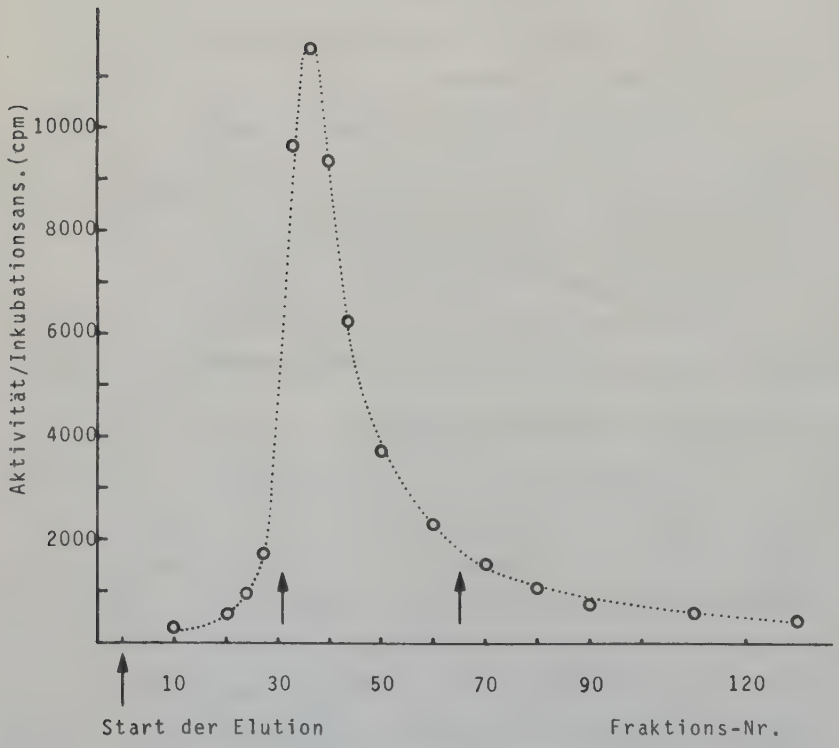
Die Enzymlösung wurde auf eine mit Kaliumphosphat-Puffer (5 mM, ph 7,0) äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (DEAE SS, 320 x 40 mm) aufgetragen. Nach dem Einziehen der Lösung wurde zunächst mit 1050 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, ph 7,0) gewaschen. Mit 4000 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,3 M, ph 7,0) wurde das Enzym in 10 ml-Fraktionen eluiert.

Die Fraktionen wurden stichprobenweise auf ihren Gehalt an Proteinkinase mittels eines Gilman-Testes geprüft. Dazu wurden 0,8 pMol ^{3}H-cAMP (20 µl „Mix" - siehe 3.8.2.) mit 10 µl der jeweiligen Fraktion 14 h lang inkubiert und anschließend die gebundene Menge an ^{3}H-cAMP bestimmt.

Das Ergebnis dieses Tests zeigt Abb. 3 :

Abb. 3 : DEAE-Cellulose-Chromatographie der Proteinkinase
Aktivitätsverteilung nach Elution

Inkubation von 10 µl Proteinkinase-Präparation mit 0,8 pMol ^{3}H-cAMP 14 h bei 0° C ;
die Fraktionen zwischen den Pfeilen wurden vereinigt



Bei dem erhaltenen Aktivitätsgipfel handelt es sich um den - auch von Gilman (27) verwendeten - „DEAE II"-Gipfel.

Die Fraktionen 31 - 65 wurden vereinigt und wie oben beschrieben dialysiert. Die nach der Dialyse erhaltene Enzymlösung (380 ml, Proteinkonzentration 0,86 mg/ml - bestimmt mit der Methode nach Warburg und Christian (33)), wurde zur Charakterisierung der Proteinkinasepräparation verwendet.

3.10.1. Charakterisierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Für die weitere Verwendung als Bindungsprotein für den Gilman-Test wurde an Hand von 2 Gilman-Tests die ungefähre Sättigungskonzentration für cAMP bestimmt.

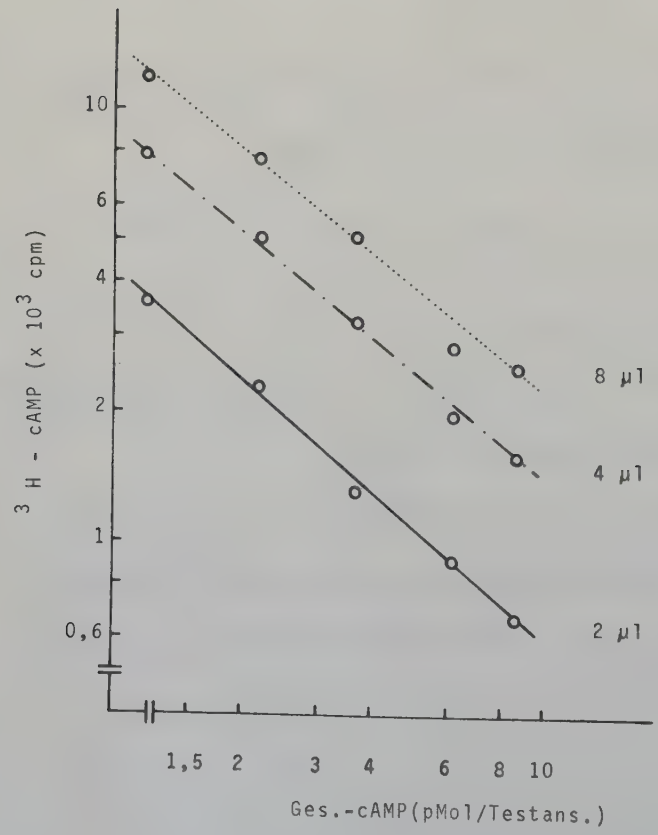
a) Bindung von ^{3}H-cAMP an unterschiedliche Mengen von Proteinkinase (Abb. 4)

Es wurden Eichkurven mit 2 - 4 - 8 µl (≙ 1,72 - 3,44 - 6,88 µg Protein) der obigen Proteinkinase-Präparation/Inkubationsansatz gemessen. Die ^{3}H-cAMP-Menge war mit 1,2 pMol/Testansatz konstant.
Wie Abb. 4 zeigt, sind die Eichkurven bei allen drei Proteinkonzentrationen linear, d.h. auch bei 8 µl Enzymlösung/Testansatz ist die eingesetzte ^{3}H-cAMP-Konzentration größer als die zur Sättigung des Enzyms erforderliche.

Abb. 4 : Bindung von cAMP an unterschiedliche Mengen von Proteinkinase

2 - 4 - 8 µl (≙ 1,72 - 3,44 - 6,88 µg Protein) der Proteinkinase-Präparation wurden mit 1,2 pMol ^{3}H-cAMP und 0 - 7,5 pMol cAMP 12 h bei 0° C inkubiert

Neben den Geraden ist die eingesetzte Menge an Proteinkinase-Präparation (µl/Testansatz) angegeben

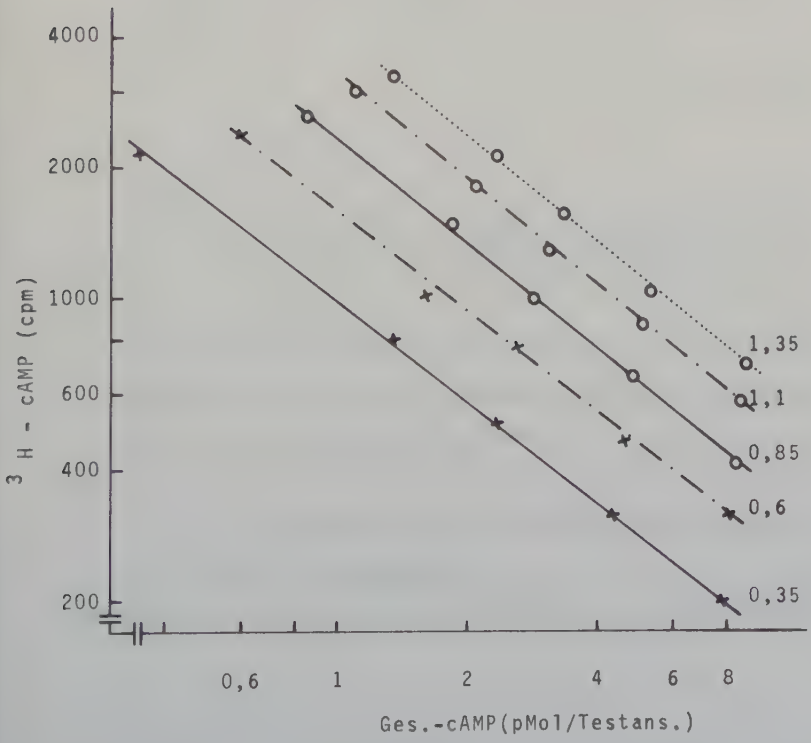


b) Bindung von unterschiedlichen Mengen ^{3}H-cAMP an konstante Mengen Proteinkinase-Präparation (Abb. 5)

Es wurden 2 µl (≙ 1,72 µg Protein) Enzymlösung eingesetzt. Die ^{3}H-cAMP-Menge wurde von 0,35 - 1,35 pMol/ Testansatz variiert.

Abb. 5 : Bindung von unterschiedlichen Mengen ^{3}H-cAMP an konstante Mengen Proteinkinase-Präparation

2 µl (≙ 1,72 µg Protein) wurden mit 0,35 - 1,35 pMol ^{3}H-cAMP und 0 - 7,5 pMol cAMP 12 h bei 0° C inkubiert. Neben den Geraden ist die eingesetzte Menge an ^{3}H-cAMP (pMol/Testansatz) angegeben



Auch bei diesen 5 Kurven ist der Verlauf linear, d.h. die zur Sättigung der Proteinkinase unter diesen Bedingungen erforderliche cAMP-Konzentration ist kleiner als 7,4 nM !

Auf Grund der Ergebnisse aus a) und b) ist die cAMP-Sättigungskonzentration gleich oder kleiner als 3,2 nM/µl Kinase-Präparation. Um den Pipettierfehler bei der Zugabe des Bindungsproteins (siehe 3.8.2.) kleiner zu halten, wurde die Enzymlösung 1 + 1 mit Dialysepuffer verdünnt und zur Stabilisierung der Proteinkinase Rinder-Serumalbumin (1 mg/ml Lösung) zugesetzt.
Auf diese Weise erhielten wir 760 ml Proteinkinase-Lösung, die in 3 ml-Portionen bei -25° C bis zur Verwendung eingefroren wurde.

3.11. ^{3}H - Desmethylimipramin - Präparation

Das bei Mensch und Ratte im Organismus aus Imipramin primär entstehende Desmethylimipramin (DMI) soll für die antidepressive Wirkung von Imipramin allein verantwortlich sein (34,35).
Eine einfache und genaue Bestimmung der Ausbeute von DMI neben IMI ist bei Anwendung von markiertem DMI möglich. Da dies käuflich nicht zu erwerben war, wurde mit verschiedenen

Methoden in vivo und in vitro versucht, aus ^{3}H-IMI markiertes DMI hoher spezifischer Aktivität präparativ herzustellen. Die Versuche wurden z.T. mit markiertem IMI durchgeführt.

a) in vivo

Einer Ratte wurden 250 µCi (≙ 3,3 µg) ^{3}H-IMI und unmarkiertes IMI i.p. appliziert. Nach 1/2 - 1 h wurde das Tier decapitiert, Leber, Lunge, Niere und Gehirn zur Extraktion des nach Metabolisierung hauptsächlich in diesen Organen kumulierten (36) (^{3}H-)DMI homogenisiert und das Homogenat mit n-Heptan ausgeschüttelt. Dingell et al. (37) trennen DMI und IMI, indem sie die Heptan-Phase - die DMI und IMI als Base enthält - mit Phosphat-Puffer (0,2 M, ph 5,9) extrahieren.
Dabei treten bei einmaliger Anwendung 80 % DMI, aber nur 10 % IMI in den Puffer über.
Die Extraktion gelang. Bei der Überprüfung der Reinheit der Pufferphase mit DC (Sorbens : Kieselgel 60) stellte sich jedoch heraus, daß 1.) der IMI-Anteil weit höher als 10 % war und 2.) der DMI-Anteil nach Trennung auf der DC-Platte zerfiel.
Der Substanzverlust ist wahrscheinlich auf die hohe katalytische Aktivität von Kieselgel zurückzuführen. Gerade bei Einsatz von Massen im Mikrogramm-Bereich (und kleiner) können solche Prozesse eine präparative Herstellung verhindern.

Daraufhin wurde versucht, mit anderen Methoden eine Trennung

von DMI und IMI herbeizuführen :

1) Gegenstromverteilung nach Craig (38)

System PO_4-Puffer (0,2 M, ph 5,8) : n-Heptan = 1 : 1

Wurde die Heptan-Phase direkt eingesetzt, betrug die DMI-Ausbeute in der Pufferphase etwa 77 % der Theorie. IMI war nicht nachweisbar.
Waren nach der Organ-Extraktion (siehe a)) auch Lipide in der Heptan-Phase, konnte keine ausreichende Trennung erzielt werden.

2) Verteilungschromatographie auf Cellulose-Platten

Mit dem System PO_4-Puffer (0,2 M, ph 5,8) : n-Heptan = 1 + 3 war keine ausreichende Trennung möglich.

3) Selektive Bindung an Kationen-Ionenaustauscher

a) Dowex 50 WX 8 (200-400 mesh)
Im ph-Bereich 6,0 - 6,2 (PO_4-Puffer 0,2 M) wurden DMI und IMI im selben Ausmaß gebunden.

b) Carboxymethyl-Cellulose (CM 52 Whatman)
Ergebnis wie bei Dowex

b) in vitro

Im biochemischen Praktikum des Pharmazeutischen Instituts der Universität Tübingen wird eine Mikrosomenpräparation (aus Rattenleber) verwendet,

um den Arzneimittelabbau in vitro zu demonstrieren. Das Substrat Aminophenazon wird dabei an der Dimethylamino-Gruppe demethyliert.
In mehreren Ansätzen konnte trotz Variation der Substrat-Konzentration (3,9 - 11,8 mM) kein Abbau von IMI bzw. keine Synthese von DMI beobachtet werden. Parallel-Inkubationen mit Aminophenazon (Endkonzentration 12,5 mM) zeigten deutliche Demethylierung.

Da keine der aufgeführten Methoden zu einer Trennung der Substanzen führte, wurde auf die Verwendung von markiertem DMI verzichtet und unmarkiertes zur Ausbeutebestimmung eingesetzt.

3.12. Bestimmung der Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin in Cortex und Cerebellum

Breiter et al.(39) beschrieben eine Methode zur Extraktion verschiedener lipophiler Arzneistoffe aus wässrigen Lösungen (Harn, Serum u.a.) mittels Extrelut^{R}-Fertigsäulen (DBP 2 410 033). Das Verfahren bietet neben emulsionsfreien, reineren Eluaten weitere Vorteile wie höhere Wiederfindungsraten, sowie Einsparung von Lösungsmittel, Material und Zeit.

An Hand dieser Methode konnte in Vorversuchen ^{14}C-IMI aus

Harn bei pH 9 - 10 extrahiert werden. Die Ausbeute betrug - reproduzierbar - 74 - 79 %.
Unter Einbeziehung von Trichloressigsäure, verschiedener Detergentien (Brij 30-35-56-58, Lubrol-PX, SDS, Triton X-100(405)), Natriumchlorid, deren Kombinationen sowie einer „Schütteltrichter"-Extraktion (Vorschrift modifiziert nach Breyer-Pfaff et al. (40)) wurde versucht, den Anteil freien Imipramins im Überstand nach Zentrifugation bzw. Extraktion eines Hirnhomogenats zu erhöhen.
Nach Homogenisation mit PO_4-Puffer (0,1 M, pH 12) und Extraktion mit n-Heptan bzw. 0,1 N HCl (41) erhielt man eine praktisch proteinfreie, klare Lösung, die bis zu etwa 80 % IMI enthielt. Dennoch war es nicht möglich, Imipramin quantitativ von der Extrelut^R-Säule zu eluieren.

Daraufhin wurde das Verfahren nach Breyer und Schmalzing (41) - modifiziert - zur Extraktion bzw. quantitativen Bestimmung von DMI und IMI herangezogen.

3.12.1. Prinzip

DMI und IMI werden bei pH 12 mit n-Heptan aus dem Homogenat extrahiert. In der folgenden Säureextraktion bleiben lipophile Stoffe in der Heptan-Phase, während DMI und IMI als Salz in die wäßrige Phase übertreten. Der pH-Wert wird auf 9 - 10 gebracht, und die Basen mit Benzol extrahiert. Nach Entnahme eines Aliquots zur Bestimmung der ^{14}C-IMI - Ausbeute werden DMI und IMI dünnschicht-chromatographisch

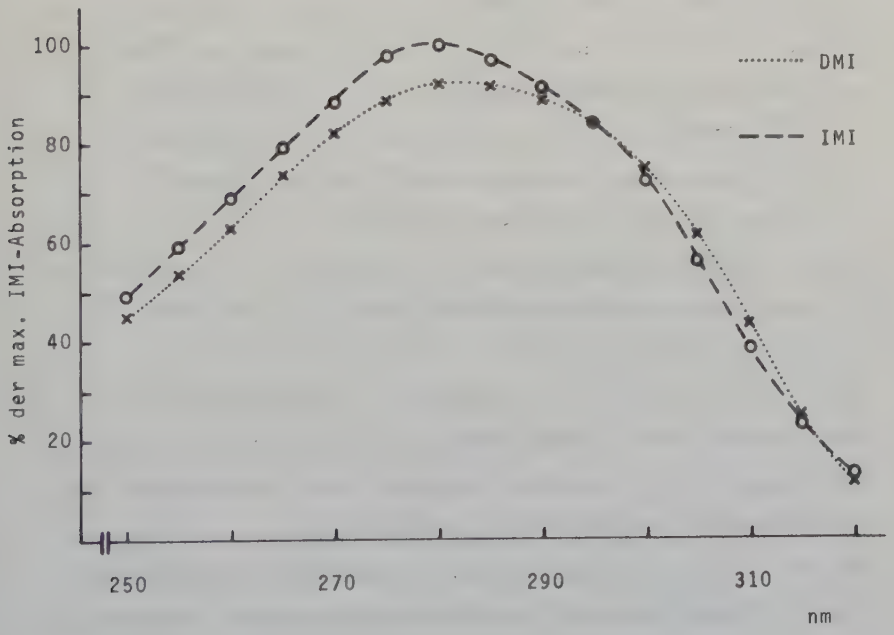
getrennt. Es folgt eine Remissionsmessung „in situ" (auf der Platte) :

Unter 90^{0} auf die Platte eingestrahltes, monochromatisches Licht wird je nach der Molekülmenge bzw. Masse der erfaßten Substanz mehr oder weniger absorbiert. Das unter einem Winkel von 45^{0} reflektierte Rest-Licht wird erfaßt.

Wie aus Abb. 6 ersichtlich, erreicht die Absorption von DMI und IMI bei etwa 280 nm ein Maximum.

Abb. 6 : Orts-Absorptionsspektrum von DMI und IMI

Geräte-Einstellungen siehe Seite 39 !



An Hand von mitgetrennten bzw. mitgemessenen Standards wird eine Eichkurve erstellt und daraus die Masse DMI und/oder IMI pro Auftragevolumen errechnet.

3.12.2. Extraktion

Präparation der Gehirnteile siehe 3.5.
Das Gewebe wurde auf Trockeneisquadern oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach Überführen in Reagenzgläschen bis zur Verwendung bei -25° C aufbewahrt.
Die aufgetauten Gehirnareale wurden in 3 ml-Glashomogenisatoren eingewogen, die 3 ml Phosphatpuffer (pH 12), etwa 0,7 nCi (≙ 20 ng Base) ^{14}C-IMI und - bei den Kontrollen - 1,14 µg DMI-HCl (≙ 1 µg Base) enthielten. Nach 1 min Homogenisation bei Eiskühlung wurde die Gewebesuspension mit 2 x 500 µl Puffer in Zentrifugengläser überführt, 3 ml n-Heptan zugegeben, 2 min geschüttelt und bei 2850 g 20 - 30 min zentrifugiert (Variofuge S).
Diese Extraktion wurde dreimal wiederholt.
Die vereinigten Heptan-Überstände wurden in 50 ml-Spitzkolben am Rotationsverdampfer bei 25° C fast vollständig zur Trockne gebracht. Der Rest, der die Basen sowie noch andere durch Heptan extrahierbare, lipophile Stoffe enthielt, wurde mit 2 x 1 ml n-Heptan in Zentrifugengläser überführt, die 2 ml 0,1 N H_2SO_4 enthielten.
Anschließend wurde 1 min geschüttelt und bei 1600 g 5 min zentrifugiert (Variofuge S). Der Überstand wurde verworfen.

Nach einer zweiten Reinigung der wäßrigen Phase wurde mit 200 µl NH_3 25 % auf pH 9 - 10 eingestellt. Die Basen wurden mit 3 x 2 ml Benzol extrahiert. Dabei wurde - wie oben - 1 min geschüttelt und bei 1600 g 5 min zentrifugiert. Die vereinigten Benzol-Phasen wurden am Rotationsverdampfer bei 25° C eingeengt. Der ölige, gelbliche Rückstand wurde in 3 x 750 µl Diäthyläther aufgenommen und in Reagenzgläschen überführt, die bis zur weiteren Verwendung bei -25° C gelagert wurden.

3.12.3. Chromatographie

Unter Begasung mit Stickstoff wurde der Äther im Wasserbad bei 25° C verdrängt.
Mit einer Hamilton^R-Spritze wurden 50 µl Benzol einpipettiert. Nach leichtem Schütteln wurden mit einer zweiten Hamilton^R-Spritze zur Bestimmung der ^{14}C-IMI-Ausbeute 20 µl (≙ 40 %) entnommen und in LSC-Gefäße überführt. Nach „Trocknen" der Gefäße im Abzug und Zugabe von 5 ml BRAY wurde die Radioaktivität der Proben im Flüssig-Scintillationszähler bestimmt.
Der gesamte Rest wurde nun zusammen mit je 4 - 5 DMI- und IMI-Standardlösungen auf DC-Fertigplatten (Sorbens: Kieselgel 60, 20 x 20 cm, ohne Fluoreszenz-Indikator) aufgetragen. Ein eventuell in den Gläschen verbliebener Rest an ^{14}C-IMI bzw. unmarkiertem DMI („Rest-Radioaktivität") wurde ermittelt, indem dieser mit 3 x 1 ml Äther in LSC-Gefäße

überführt wurde. Nach „Trocknen" im Abzug wurde wie oben die Radioaktivität bestimmt.

Die Platten wurden nach Merck in

Chloroform : Methanol : NH_3 25 % = 90 : 10 : 1

entwickelt. Die Laufzeit für 10 cm betrug 30 - 35 min. Sofort anschließend wurde mit dem DC-Spektralphotometer die Lichtremission der einzelnen Bahnen gemessen und mit einem Schreiber registriert.

Die Geräte-Einstellungen waren :

DC-Spektralphotometer KM 3	Deuteriumlampe	280 nm
	Spaltbreite	1 mm
	Vorschub	30 mm/min
	Der Meßkopf befand sich 2 mm über der Plattenoberkante	
Anzeigegerät PMQ II	Einstellung (bei gespreizten Registrierungen in Absorption)	Komp A
	Meßart	Remission
	Dämpfung	III/3
Schreiber Servogor S (Typ 541)	Empfindlichkeit	0,5 - 10 mV
	Papiervorschub	30 mm/min
	Polwechsel (minus an plus) !	

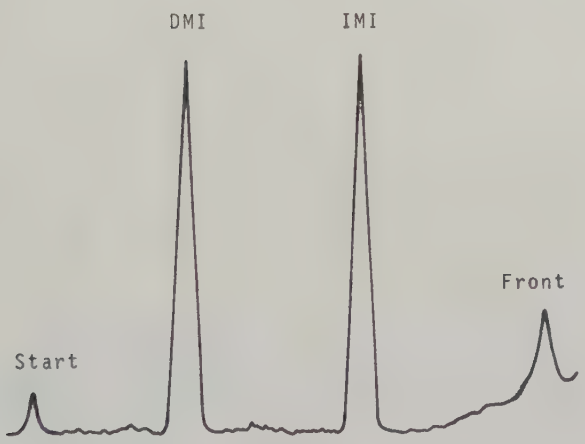
Wie aus Abb. 7 ersichtlich, betrugen die R_f-Werte

für DMI ca. 0.32,

für IMI ca. 0.63.

Abb. 7 : Trennung von DMI und IMI

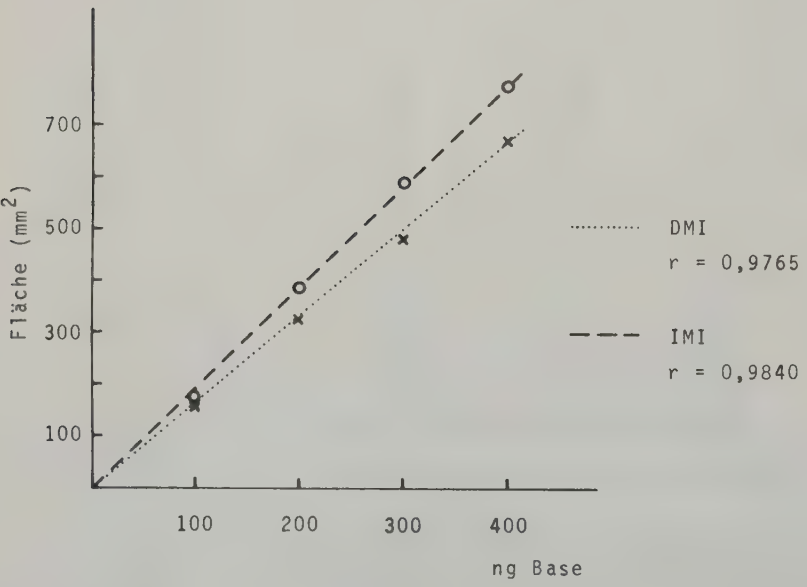
Laufmittel : $CHCl_3$: MeOH : NH_3 25% = 90:10:1
Laufstrecke : 10 cm - Zeit : 30 - 35 min



Zur Erstellung der Eichkurve wurden zuerst die Peak-Flächen bestimmt, indem das Produkt aus der Höhe und der Breite in halber Höhe eines Peaks gebildet wurde. Wie Abb. 8 zeigt, besteht zwischen den aufgetragenen Massen und den sich ergebenden Flächen Linearität.

Abb. 8 : Eichkurve zur Berechnung der DMI(IMI)-Konzentration

Peakflächen in Abhängigkeit der aufgetragenen Massen ; Registrierung bei 280 nm



Die mathematische Berechnung der Eichkurve und des DMI- und IMI-Gehalts der Proben in ng Base/Auftragepunkt erfolgte mit einem Computerprogramm („lineare Regression"). Die Ergebnisse wurden in

ng DMI(IMI)/ g Feuchtgewicht

umgerechnet.

3.13. Bestimmung der Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin und 60 min-Inkubation in Cortex und Cerebellum

Das in 3.12. angewandte Verfahren zur Extraktion von DMI und IMI aus Gehirngewebe wurde hier verlassen, da die Ausbeuten sehr schwankend waren.
Stattdessen wurde die Methode nach Breyer-Pfaff et al. (40) angewandt. Eine konstantere und durchschnittlich höhere Ausbeute erreichte man bei Verwendung siliconisierter Glasgeräte.

3.13.1. Prinzip

Siehe 3.12.1.

3.13.2. Extraktion

Siehe 3.12.2.

Unterschiede :

a) Homogenisation in 1 ml 10% NaCl (Aussalzeffekt!)
b) Zugabe von SDS (2 %, 100 µl), NH_3 (25 %, 250 µl) und 3 x 500 µl 10% NaCl, dann n-Heptan-Extraktion (1 x 5 ml!)
c) Entnahme eines Heptan-Aliquots
d) Entnahme zweier Benzol-Aliquote

3.13.3. Chromatographie

Siehe 3.12.3.

Unterschiede : a) 10 µl (≙ 20 %) Benzol-Aliquot für ^{14}C-IMI-Ausbeute

b) Auftragung eines Aliquots auf DC-Platte : 20 µl ≙ 40 %

Zur Berechnung der DMI(IMI)-Konzentrationen mußte die Verwendung eines Aliquots (nicht des Restes!) zur DC-Trennung berücksichtigt werden.

3.14. Bestimmung der Rückaufnahme von Dopamin und Noradrenalin in Schnitten von Cortex und Cerebellum

3.14.1. Prinzip

In Krebs-Ringer-Medium bei 37° C inkubierte Gehirnschnitte nehmen Dopamin (Noradrenalin) aus dem Medium in das präsynaptische Axon auf.
Nach Homogenisation der Schnitte und Zentrifugation kann die Menge an aufgenommenem Dopamin (Noradrenalin) z.B. durch Messung der Radioaktivität eines Aliquots des Überstandes bestimmt werden.

3.14.2. Inkubation

Präparation und Inkubation der Schnitte bis einschließlich 40 min-Inkubation siehe 3.5.

Die Schnitte wurden 2 x mit frischem, warmem Krebs-Ringer-Medium gewaschen. Mit der in 3.5. beschriebenen Pasteurpipette wurden die Schnitte auf 2 kleine Bechergläser (bei den Dosis-Wirkungs-Kurven und den Kinetik-Experimenten: bis zu 6) verteilt, die 9,5 ml Krebs-Ringer-Medium enthielten.
Ein Becherglas enthielt zusätzlich Imipramin in einer Endkonzentration von 10^{-6} M (Dosis-Wirkungs-Kurven : 5 Bechergläser 10^{-8} M - 10^{-4} M).
Nach 10 min Inkubation (ohne Waschen) wurde die Reaktion durch Zugabe einer (^{3}H-)DA(L-NA)-Lösung (100 µl ≙ 1-2 µCi ≙ 100 pMol (^{3}H-)DA(L-NA)) gestartet.
Nach 1,5 - 8 min wurde das radioaktive Medium auf einem Büchner-Trichter abgesaugt. Wie in Vorversuchen festgestellt worden war, war die Rückaufnahme innerhalb dieses Zeitintervalls linear.
Unmittelbar darauf wurden die Schnitte mit 50 ml eiskaltem Krebs-Ringer-Medium gewaschen, um eventuell noch an den Schnitten haftendes radioaktives Medium wegzuspülen.
Nach Homogenisation in 1 ml eiskalter 4 %-iger Trichloressigsäure wurde bei 1600 g 10 min zentrifugiert (Variofuge S). Der klare Überstand wurde abpipettiert und ein 500 µl-Aliquot in LSC-Gefäße überführt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte wie in 3.7. beschrieben.

Zur individuellen Quench-Korrektur wurde nach der 1. Zählung jeder Probe dieselbe Menge Radioaktivität einer ^{3}H-markierten Substanz (z.B. 1 nCi ^{3}H-cAMP) zugegeben und alle Proben einer 2. Messung unterworfen.
Die Ergebnisse wurden in

fMol DA(L-NA) Aufnahme/ mg Protein x min

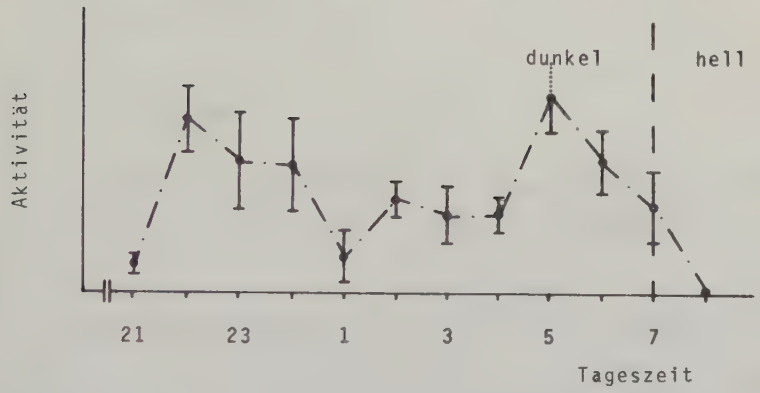
angegeben.

3.15. Messung der motorischen Aktivität

Die Apparatur zur Messung der motorischen Aktivität bestand aus 6 flachen Gehäusen zur Aufnahme der Tierkäfige und einem Registrier- und Anzeigegerät.
In den Gehäusen befinden sich mehrere vertikal montierte Leiterspulen.
Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß sich die Induktivität dieser Spulen ändert, wenn sich ein Gegenstand bzw. eine Ratte durch das magnetische Feld bewegt. Der induzierte Spannungsstoß wird registriert.
In einem Vorversuch über 12 h mit 6 unbehandelten Ratten wurden die Perioden der höchsten Aktivität ermittelt.
Wie aus Abb. 9 ersichtlich ist, bewegen sich die Tiere

zwischen 21^{30} - 22^{30} und zwischen 4^{30} - 5^{30} am häufigsten.

Abb. 9 : Spontane motorische Aktivität von Sprague Dawley-Ratten in Abhängigkeit von der Tageszeit



Die Messung der motorischen Aktivität nach Vorbehandlung der Ratten mit Imipramin erfolgte daher zwischen 22^{00} - 23^{00}.

Die tagsüber gemeinsam in einem Käfig sitzenden Tiere wurden gegen 21^{30} auf Einzelkäfige verteilt. Um Verwechslungen zu verhindern, war jedes Tier eindeutig mit einer schwer abwaschbaren Farbe gekennzeichnet.
Während der Messung hatten die Tiere nur Zugang zu Futter; die Trinkflaschen wurden für diese Zeit entfernt, um Meßfehler durch zufälliges Trinken auszuschalten.
Nach der Messung um 23^{00} wurden die Tiere wieder zusammen in einen Käfig gesetzt.

Die Einstellungen am Registriergerät waren :

Ausdruckintervall		10 min
Activity-level	Tier 1 - 5	3,0
	Tier 6	3,5
Tuning		0,6 - 0,7

3.16. Bestimmung der Dopamin- und Noradrenalin-Spiegel in Cortex und Striatum

Die Bestimmung erfolgte - mit kleinen Änderungen - nach C.C. Chang (42).

3.16.1. Prinzip

Nach Homogenisation und Extraktion der Katecholamine mit n-Butanol-HCl und Überführen der Hydrochloride in die wäßrige Phase, werden - nach Zugabe von Natriumacetat - bei pH 7,5 die Katecholamin-acetate spezifisch an Al_2O_3 (präpariert nach Crout (43)) adsorbiert, während eventuell vorhandene fluoreszierende „Nicht-Katecholamin-acetate" im Überstand verbleiben.
Die bei pH 4,0 eluierten Katecholamin-acetate werden dann bei pH 6,5 mit Jod-Lösung zu den entsprechenden „Adreno-chromen" oxydiert. Durch Zugabe einer alkalischen Sulfit-

Lösung wird die Reaktion gestoppt und gleichzeitig die „Adrenochrome" zu den „Adrenolutinen" umgelagert. Anschließend bringt man den pH-Wert auf etwa 5,4. Damit wird eine beschleunigte Bildung der notwendigen ionischen Form des „Lutins" bzw. eine schnellere Erhöhung und Stabilisierung der Fluoreszenz erreicht (44).
An Hand von Eichkurven wurde der Gehalt an Dopamin und Noradrenalin bestimmt.

3.16.2. Extraktion

Präparation der Gehirnteile siehe 3.5.

Fixation der Gehirnteile siehe 3.12.2.

Die aufgetauten Gehirnareale wurden in 3 ml-Glashomogenisatoren eingewogen, die 2 ml n-Butanol-HCl (≙ 0,01 N HCl) und etwa 5 nCi (≙ 20 ng Base) ^{14}C-NA oder dieselbe Aktivität bzw. Menge ^{14}C-DA als Tracer für die Ausbeutebestimmung enthielten.
Mit einem Glas-Pistill, das an einem Rührmotor angekuppelt war, wurde 1 min bei Eiskühlung homogenisiert und bei 1600 g 5 min zentrifugiert (Variofuge S).
Der klare Überstand wurde in siliconisierte 13 ml-Reagenzgläser, die 4 ml n-Heptan und 2 ml 0,1 N HCl enthielten, überführt. Mit einem Taumelschüttler wurde 10 min geschüttelt, anschließend wie oben zentrifugiert.
Die wäßrige (untere!) Phase wurde in siliconisierte Reagenzgläser gegeben, die je 300 mg Al_2O_3 (präpariert nach Crout (43)),

500 µl 2 M Natriumacetat und 200 µl 1 N NaOH enthielten. Nach kurzem Schütteln wurde mit Spezial-Indikatorpapier der ph-Wert überprüft (mindestens 7,0!) und wie oben geschüttelt und zentrifugiert.
Der Überstand wurde verworfen. Nach Waschen des Aluminiumoxids mit 1 ml Wasser, wurden die Katecholamin-acetate mit 3 x 1 ml 0.1 N Essigsäure eluiert.
Das vereinigte Eluat wurde gemischt, 500 µl in LSC-Gefäße pipettiert, 5 ml BRAY zugegeben und die Ausbeute an ^{14}C-DA (L-NA) analog 3.7. bestimmt.

3.16.3. Oxidation

Sie erfolgte in Einmal-Reagenzgläschen (Polystyrol - Volumen 3,5 ml).
Folgende Lösungen wurden benötigt :

2) Essigsäure (HAc)	0.2 N
4) Standard	10^{-9} g DA(L-NA)-Base/µl
5) EDTA	0.1 M in 1 M Na-acetat, + NaOH ⟶ ph 7
6) NaOH	ca. 0.75 N
7) Jod	J_2 1.1 %/NaJ 6.7 % in H_2O
8) alkal. Sulfit	$Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$ 5% in 2.5 N NaOH
9) Essigsäure	ca. 6.8 N

Um die geforderten ph-Werte von 6,5 bzw. 5,4 zu erreichen,

wurden die Lösungen 2,6,7,8 und 9 - ausgehend von 1 ml Eluat - in Vorversuchen aufeinander abgestimmt.

Pipettierschema (alle Volumina in µl)

	H_2O	HAc	Eluat	Stand.	EDTA	NaOH	Jod	alkal. Sulfit	HAc
Standard	575 - 595	400	-	5 - 25	200	100	100	200	100
Probe	-	-	1000	-	"	"	"	"	"
Leerwert	600	400	-	-	"	"	"	"	"

1 ml Eluat bzw. Standard oder Leerwert wurde durch Zugabe von 200 µl EDTA und 100 µl NaOH auf pH 6,5 eingestellt.
100 µl Jod-Lösung wurden einpipettiert und kurz geschüttelt.
Nach genau 2 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl alkalischer Sulfit-Lösung gestoppt.
Nach weiteren 2 min wurde die Lösung durch Zugabe von 100 µl Essigsäure auf genau pH 5,4 eingestellt.

Zur Messung der DA-Werte wurden 800 µl-Aliquote in Eppendorf-Gefäße überführt und die Lösung im Wasserbad bei 95° C für 5 min erhitzt. Nach 30 min wurde die Fluoreszenz der inzwischen auf Raumtemperatur abgekühlten Lösung gemessen (Anregung 320 nm - Emission 370 nm).

Bis zur Messung der L-NA - Werte wartete man 1 h (Anregung 385 nm - Emission 485 nm).
Die Berechnung der Eichkurve und des DA(L-NA)-Gehalts der Proben in ng Base/ml Eluat erfolgte mit Hilfe eines Computerprogrammes („lineare Regression").
Mit der nach 3.16.2. bestimmten Gewebemasse und den Ausbeuten wurden die oben erhaltenen Werte in

ng DA(L-NA)/g Feuchtgewicht

umgerechnet.

3.17. Auswertung der Versuchsergebnisse

Die statistische Berechnung der Versuchsergebnisse wurde mit Hilfe eines programmierbaren Rechners (HP 65) durchgeführt. Alle Ergebnisse werden ± mittlerer Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) angegeben.
Die Signifikanzberechnungen wurden unter Anwendung des Student´s t-Test durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

In Fortführung der Untersuchungen von Vetulani et al. (20) und Schultz (21) war es zunächst interessant, Aufschluß über die Art des Einflusses einer Vorbehandlung mit IMI auf die noradrenergen Rezeptoren zu erhalten.

4.1. cAMP-Bildung in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex

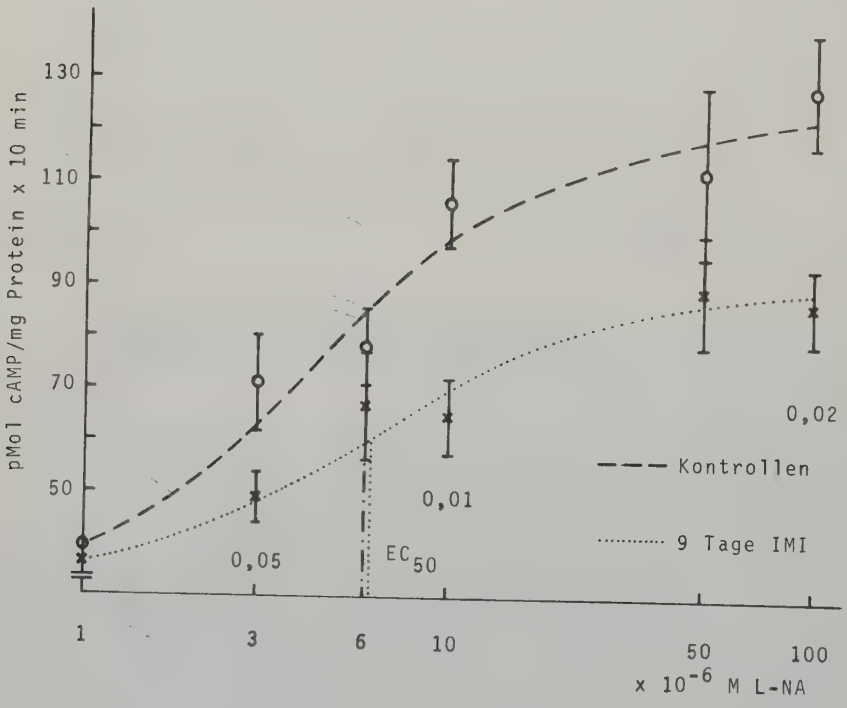
Ratten wurden 9 Tage mit Imipramin vorbehandelt und die cAMP-Bildung in Abhängigkeit der L-NA-Konzentration in Gehirnschnitten der Cortex gemessen.
Das Ergebnis ist aus Tabelle 1 und Abb. 10 ersichtlich.

Tabelle 1 : Angaben in pMol cAMP/mg Protein x 10 min

		Kontrollen	9 Tage IMI	
-	NA	56,9 ± 8,3 (6)	49,1 ± 7,2 (6)	n.s.
$1 \cdot 10^{-6}$ M	L-NA	39,4 ± 1,1 (4)	36,7 ± 4,7 (6)	n.s.
$3 \cdot 10^{-6}$ M	"	71,3 ± 9,5 (4)	49,1 ± 5,1 (7)	$2P < 0,05$
$6 \cdot 10^{-6}$ M	"	78,4 ± 7,6 (4)	67,0 ± 10,6 (6)	n.s.
$10 \cdot 10^{-6}$ M	"	106,2 ± 8,4 (5)	64,9 ± 7,6 (6)	$2P < 0,01$
$50 \cdot 10^{-6}$ M	"	121,2 ± 16,5 (5)	89,6 ± 10,8 (6)	n.s.
$100 \cdot 10^{-6}$ M	"	128,0 ± 10,9 (5)	86,5 ± 7,5 (6)	$2P < 0,02$

Abb. 10 : cAMP-Bildung in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex

Die Stimulationszeit betrug 10 min, die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt



Die Affinität von Noradrenalin zum Rezeptor bleibt trotz Vorbehandlung mit IMI erhalten: die EC_{50}-Werte für Noradrenalin sind mit $6 \cdot 10^{-6}$ M identisch. Die maximale Stimulierbarkeit

der Adenylatcyclase, die bei etwa 10^{-4} M L-NA bei Kontrolltieren und vorbehandelten Tieren erreicht ist, nimmt jedoch entweder im Sinne der Einwirkung eines nicht-kompetitiven Antagonisten (verminderter Maximaleffekt) oder im Sinne einer verminderten Zahl von Rezeptoren ab.

4.2. Noradrenalin-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit Imipramin in Cerebellum und Striatum

Noradrenerge Neuronen sind keineswegs nur in der Großhirnrinde der Ratte, sondern auch in anderen Gehirnregionen vorhanden.
Mehrere Literaturhinweise ließen es daher interessant erscheinen, in die Prüfung auf Subsensitivität noradrenerger Neuronen nach Vorbehandlung mit IMI auch das Cerebellum und das Striatum mit einzubeziehen :

Purkinje-Zellen - im Stratum gangliosum der Kleinhirn-Cortex gelegen - zeigen nach mikroiontophoretischer Applikation von Noradrenalin Hyperpolarisation (45) und einen intrazellulären Anstieg von cAMP (46).

Im sogenannten Striatum befindet sich der überwiegende Teil des im Gehirn vorkommenden Dopamins, dem unmittelbaren Vorläufer von Noradrenalin. Dieses Areal besteht aus folgenden Kernen : Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus (25).

Kebabian et al. (47) und Horn et al. (48) fanden im Striatum - aber nicht im Cerebellum - eine Dopamin-sensitive Adenylatcyclase.

4.2.1. cAMP-Bildung in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum

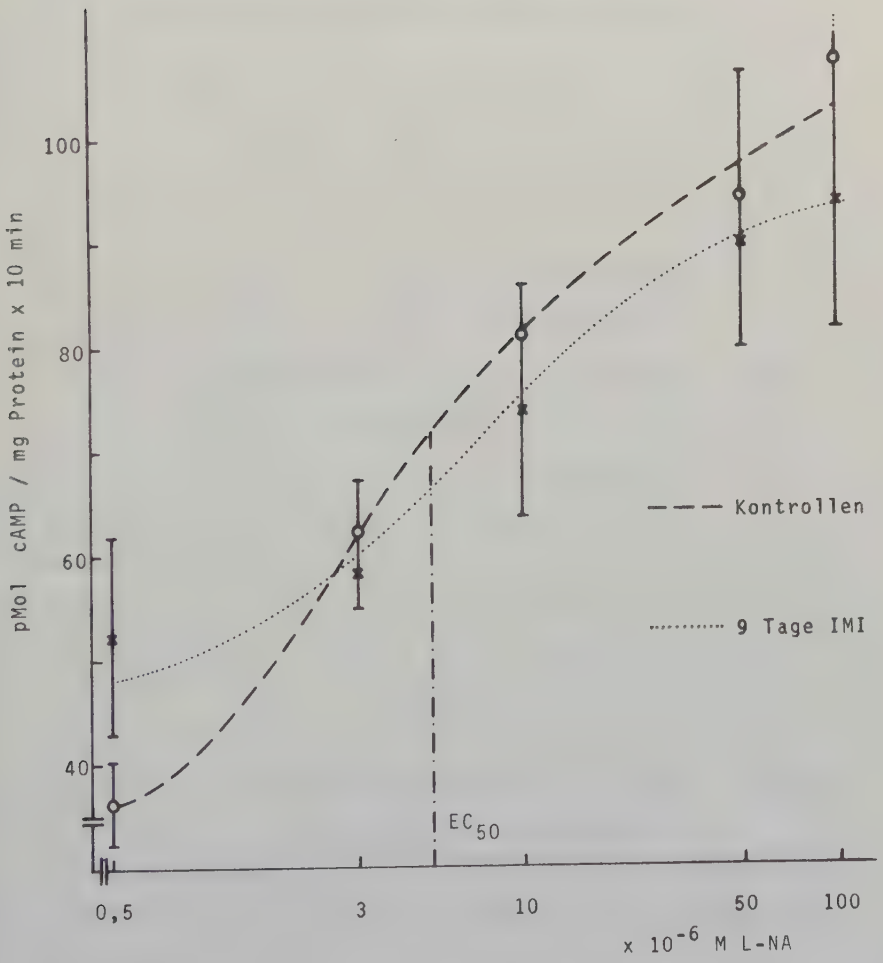
Vorbehandlung der Ratten und Messung der cAMP-Bildung wie in 4.1.
Die Proteine wurden nach der Methode von Lowry (siehe 3.9.2.) bestimmt. Um die Werte mit denen der Cortex besser vergleichen zu können, wurden alle Angaben durch den in einem Vorversuch ermittelten Faktor 4 dividiert.
Das Ergebnis zeigt Tabelle 2 und Abb. 11.

Tabelle 2 : Angaben in pMol cAMP/mg Protein x 10 min

	Kontrollen	9 Tage IMI	
- NA	35,4 ± 3,2 (6)	36,1 ± 4,3 (6)	n.s.
$0{,}5 \cdot 10^{-6}$ M L-NA	36,3 ± 4,1 (3)	52,2 ± 9,6 (6)	n.s.
$3 \cdot 10^{-6}$ M "	62,1 ± 5,0 (4)	58,3 ± 3,4 (6)	n.s.
$10 \cdot 10^{-6}$ M "	81,1 ± 4,9 (5)	73,8 ± 10,3 (6)	n.s.
$50 \cdot 10^{-6}$ M "	94,6 ± 12,1 (5)	90,0 ± 10,3 (6)	n.s.
$100 \cdot 10^{-6}$ M "	107,9 ± 26,0 (4)	94,1 ± 11,7 (5)	n.s.

Abb. 11 : cAMP-Bildung in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum

Die Stimulationszeit betrug 10 min



Auch in Schnitten des Cerebellum kann eine Adenylatcyclase via noradrenergen Rezeptor stimuliert werden.
Schon bei einer L-NA-Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M ist der intrazelluläre cAMP-Spiegel signifikant ($2P < 0{,}005$) erhöht. Wie aus der Steigung beider Kurven zu ersehen ist, scheint die maximale Stimulierbarkeit bei 10^{-4} M L-NA noch nicht ganz erreicht zu sein.

Im Gegensatz zur Cortex bewirkt aber eine 9-tägige Applikation von IMI keine signifikante Änderung :
Die Affinität von Noradrenalin zum Rezeptor (EC_{50}: jeweils etwa $5 \cdot 10^{-6}$ M L-NA) und die Stimulierbarkeit der Adenylatcyclase bleibt unverändert.

4.2.2. Dopamin (Noradrenalin)-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit Imipramin im Striatum

Zur Stimulation der Adenylatcyclase wurde die in 3.5.b) beschriebene Methode nach Forn et al. (26) verwendet.
Ratten wurden 9 Tage mit Imipramin vorbehandelt und die durch 10^{-3} M DA-stimulierte cAMP-Bildung gemessen. Die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt.
Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3 : Angaben in pMol cAMP/mg Protein x 15 min

	Kontrollen	9 Tage IMI	
- DA	22,1 ± 2,6 (6)	22,6 ± 2,2 (6)	n.s.
10^{-3} M DA	34,6 ± 2,3 (6)	33,6 ± 1,5 (6)	n.s.

Dopamin in einer Konzentration von 10^{-3} M erhöht die cAMP-Bildung hochsignifikant.
Werden die Tiere mit Imipramin vorbehandelt, bleiben Basal- und Stimulationswert unverändert.

In einem analogen Versuch wurde die durch $3 \cdot 10^{-4}$ M L-NA stimulierte cAMP-Bildung gemessen. Auch hier zeigten sich keine signifikant veränderten Basal- und Stimulationswerte nach Vorbehandlung mit Imipramin.

4.3. Reversibilität der Noradrenalin-stimulierten cAMP-Bildung nach Ende der Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex

Nimmt man an, die sich erst nach längerer IMI-Gabe entwickelnde Subsensitivität bzw. Verminderung der Anzahl noradrenerger Rezeptoren in der Cortex, sei nicht nur eine Begleiterscheinung der unmittelbaren Wirkung von IMI und/oder eines Metaboliten, sondern ein oder der Haupteffekt, der zur antidepressiven Wirkung beiträgt, dann sollten - nach Absetzen der Droge - innerhalb einer gewissen Zeit die noradrenergen Rezeptoren ihre ursprüngliche Empfindlichkeit wieder zurückgewinnen bzw. die Zahl noradrenerger Rezeptoren zunehmen.

Dafür wäre gegebenenfalls eine Neusynthese von adrenergen Rezeptoren oder Adenylatcyclase durch den biosynthetischen Apparat der Zelle verantwortlich.

Tang et al. (49) beschrieben eine Abhängigkeit der Adenylatcyclase von der Proteinbiosynthese.

Eine aufeinanderfolgende Behandlung von Ratten mit Imipramin und dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Chloramphenicol sollte daher in folgenden Fragen Klärung bringen :

1) Ist die Subsensitivität der noradrenergen Rezeptoren in der Cortex nach Absetzen der Droge reversibel ?
2) In welchem Zeitraum tritt die Reversion auf ?
3) Kann eine Hemmung der Proteinbiosynthese die Reversion hinauszögern oder verhindern ?

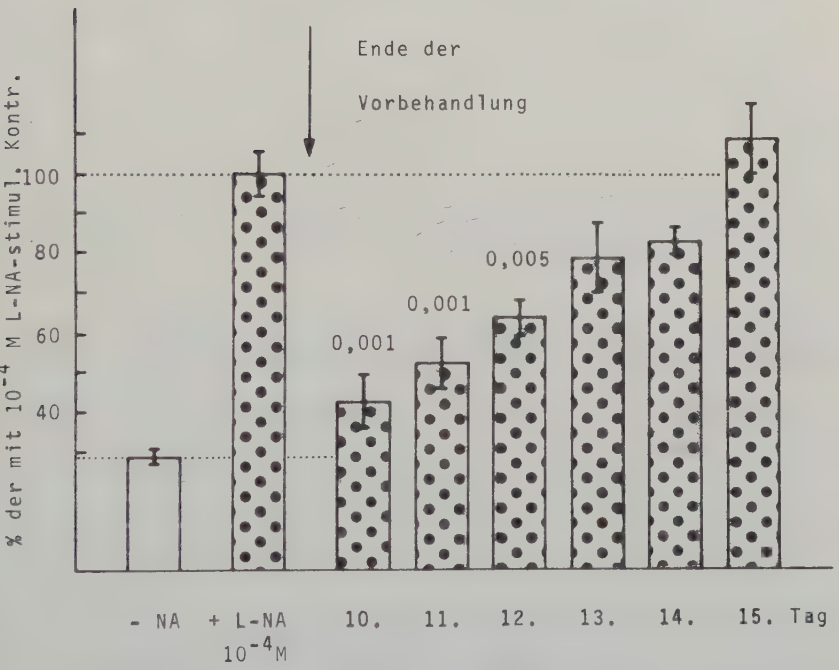
Ratten wurden - wie in 3.4. beschrieben - 9 Tage mit Imipramin und anschließend mit Chloramphenicol vorbehandelt und an Tag 10 - 15 die durch 10^{-4} M L-NA stimulierte cAMP-Bildung gemessen. Die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt.
Das Ergebnis ist aus Tabelle 4 und Abb. 12 ersichtlich.

Tabelle 4 : Angaben in pMol cAMP/mg Protein x 10 min
(Mittelwerte aus Doppelbestimmungen!)

	- NA	+ 10^{-4} M L-NA	
Kontrollen	44,8 ± 3,2 (11)	153,2 ± 9,1 (12)	
10. Tag	26,1 ± 3,0 (4)	65,4 ± 10,4 (5)	$2P < 0{,}001$
11. Tag	27,3 ± 5,0 (6)	80,0 ± 10,2 (5)	$2P < 0{,}001$
12. Tag	34,3 ± 3,4 (5)	97,8 ± 7,3 (5)	$2P < 0{,}005$
13. Tag	53,8 ± 7,9 (5)	120,5 ± 13,8 (5)	$2P < 0{,}10$
14. Tag	45,9 ± 4,3 (5)	127,0 ± 5,7 (5)	n.s.
15. Tag	69,6 ± 16,5 (5)	166,6 ± 13,9 (5)	n.s.
10.-15. Tag	42,9 ± 4,2 (30)		

Abb. 12 : Reversibilität der Noradrenalin-stimulierten cAMP-Bildung nach Ende der Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex

Die Stimulationszeit betrug 10 min



Wie erwartet ist die NA-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit IMI hochsignifikant vermindert.
Wie aus Abb. 12 ersichtlich ist, nimmt die Stimulierbarkeit der Adenylatcyclase an den Tagen 10 - 15 - nach Absetzen von IMI - annähernd linear zu.

Die Unterschiede zum entsprechenden Kontrollwert sind an Tag 10 - 12 hochsignifikant. Ab Tag 13 besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Kontrolle und vorbehandeltem Tier :

4 - 6 Tage nach Ende der IMI-Applikation haben die noradrenergen Rezeptoren ihre normale Empfindlichkeit zurückgewonnen bzw. hat ihre Zahl wieder zugenommen.
Ein ähnlicher Anstieg von Tag 10 - 15 ist auch bei den Basalwerten der vorbehandelten Tiere zu sehen. Ein signifikanter Unterschied zum Basalwert der Kontrollen besteht jedoch nicht.

In einem Kontrollexperiment (siehe Tabelle 5) wurden Ratten 9 Tage mit Imipramin und anschließend 5 Tage mit Wasser behandelt.

Tabelle 5 : Angaben in pMol cAMP/mg Protein x 10 min

	Kontrollen	9 Tage IMI	
- NA	31,4 ± 3,7 (2)	49,5 ± 16,9 (3)	n.s.
+ 10^{-4} M L-NA	162,9 ± 26,0 (2)	135,8 ± 16,7 (4)	n.s.

Auch ohne Chloramphenicol ist spätestens an Tag 15 die Subsensitivität noradrenerger Rezeptoren wieder aufgehoben bzw. ihre Zahl nicht mehr verringert.

Ein hemmender Einfluß des Proteinbiosynthese-Inhibitors Chloramphenicol auf die cAMP-Bildung im postsynaptischen Neuron der Cortex erscheint somit unwahrscheinlich.

4.4. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin in Cortex und Cerebellum

Für eine umfassende Beurteilung des Einflusses bestimmter, durch IMI und/oder DMI ausgelöster Phänomene im Zentralnervensystem auf die antidepressive Wirkung der Droge beim Menschen, ist die Kenntnis der IMI(DMI)-Konzentrationen am Wirkort nach einmaliger und chronischer Verabreichung der Substanzen eine wichtige Voraussetzung.
Die Gründe für eine Berücksichtigung von DMI bei den pharmakokinetischen Untersuchungen wurden bereits in Abschnitt 3.11. dargelegt.

Haydu und Quinn (50) fanden bei Patienten, die auf die Therapie reagierten, mit 6,0 ± 2,2 µg IMI im Plasma weniger als bei einer refraktären Gruppe, die 13,0 ± 2,4 µg IMI im Blut aufwies.

Die Therapieresistenz wurde von ihnen weniger mit ungenügender Resorption (im Duodenum (51)) als mit unterschiedlicher Verteilung und Bindung der Substanzen im Körper in Zusammenhang gebracht.

Moody et al. (52) fanden starke individuelle Differenzen im Plasmagehalt von IMI und DMI. Beträchtliche Schwankungen des Plasmagehalts waren nicht mit der verabreichten Dosis korreliert.
Auch sind die Angaben über das Auftreten des Hauptmetaboliten DMI nach IMI-Gabe widersprüchlich :
Dingell et al. (37) fanden bereits 45 min nach Applikation (40 mg/kg IMI i.p.) 19,5 µg DMI, aber nur noch 14,3 µg IMI/g

im Gehirn der Ratte.
Bickel und Weder (36) fanden im Rattengehirn ähnlich hohe Konzentrationen :
nach 1 h 21 µg/g IMI und 19 µg/g DMI; nach 24 h 9 µg/g DMI (50 mg/kg IMI-HCl i.p.).
Doch Michaelis et al. (53) und Schneider (54) konnten das von Dingell et al. (37) gesehene rasche Auftreten von DMI im Gehirn nicht bestätigen. Letztere Autoren fanden DMI erst 3 Tage nach Beginn der IMI-Applikation (20 mg/kg i.p.).
Herrmann (55) zeigte, daß die initiale Verteilung von der Art der Verabreichung abhängig ist.
Die Tatsache, daß bei all diesen Untersuchungen Imipramin intraperitoneal verabreicht wurde sowie alle bisher veröffentlichten, quantitativen Untersuchungen am Gesamthirn und nicht in definierten Regionen durchgeführt wurden, veranlaßte uns, die Konzentrationen von DMI und IMI nach oraler Applikation zu bestimmten Zeitpunkten in bestimmten Gehirnteilen zu bestimmen.

4.4.1. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex

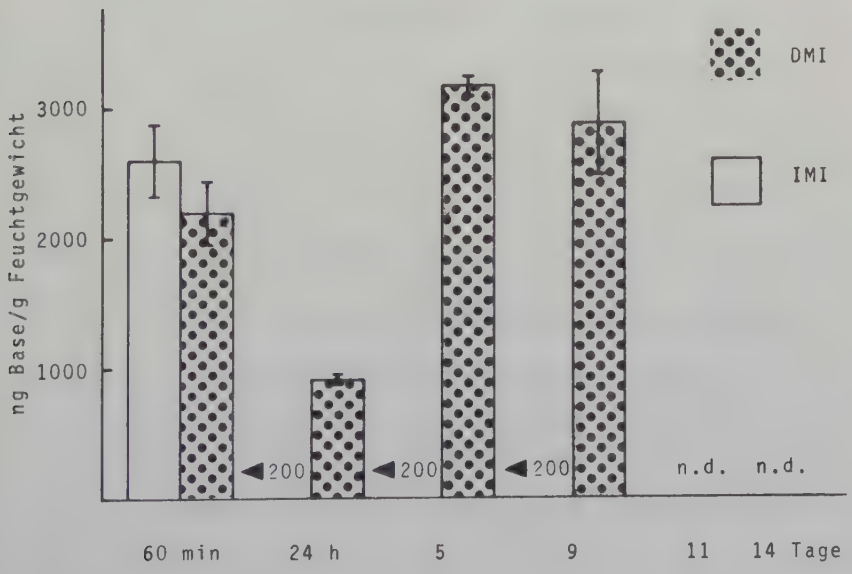
Zunächst wurden die Konzentrationen von DMI und IMI bestimmt, die nach einmaliger Applikation nach 60 min bzw. 24 h und nach mehrtägiger Behandlung (maximal 9 Tage) nach 5, 9, 11 und 14 Tagen in der Cortex der Ratte herrschen.
Ratten wurden - wie in 3.4. beschrieben - vorbehandelt und

nach 60 min, 24 h, 5, 9, 11 und 14 Tagen decapitiert und die DMI- und IMI-Spiegel bestimmt (siehe 3.12.).
Das Ergebnis zeigt Tabelle 6 und Abb. 13.

Tabelle 6 : Angaben in ng Base/g Feuchtgewicht

	DMI	IMI
60 min	2197,7 ± 245,0 (6)	2599,1 ± 277,6 (6)
24 h	918,8 ± 29,3 (5)	< 200 (3)
5 Tage	3166,7 ± 72,4 (4)	< 200 (6)
9 Tage	2887,8 ± 400,1 (5)	< 200 (5)
11 Tage	n.d.	n.d.
14 Tage	n.d.	n.d.

Abb. 13 : Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex



60 min nach oraler Gabe von IMI (50 mg IMI-HCl/kg) sind - aufgerundet - 2,2 µg DMI und 2,6 µg IMI pro g Cortexgewebe vorhanden.
Bickel und Weder (36) finden zu diesem Zeitpunkt nach intraperitonealer Applikation von 50 mg IMI-HCl/kg im Gesamthirn mit 21 µg IMI und 19 µg DMI ein fast identisches Verhältnis.
Die - im Vergleich zu den vorliegenden Untersuchungen - wesentlich höheren Konzentrationen sind wahrscheinlich auf die andere Applikationsart zurückzuführen.
Dieses „Gleichgewicht" verschiebt sich in den folgenden Stunden völlig zu Gunsten des Metaboliten DMI :
Während 23 h später IMI fast „abgeflutet" ist, beträgt die Konzentration von DMI noch etwa 920 ng/g Gewebe.
Offensichtlich ist die Elimination pro Zeiteinheit aus Rattenhirn für IMI wesentlich höher als für DMI.
Dies wird durch Untersuchungen von Bickel und Weder (36) bestätigt, die im Gesamthirn Halbwertszeiten von 0,6 h für IMI und 18 h für DMI fanden.
Wird nun weiter 5 Tage lang (ab Tag 4 : 30 mg/kg/Tag) IMI appliziert, divergiert das Verhältnis noch weiter :
Der IMI-Spiegel bleibt praktisch konstant, liegt aber unter der quantifizierbaren Nachweisgrenze von 200 ng/g Gewebe.
Die DMI-Konzentration steigt auf etwa 3 µg/g Gewebe an.

Eine weitere Vorbehandlung bringt keine wesentliche Veränderung : ein „steady-state"-Zustand ist erreicht.
Ähnliche Ergebnisse erzielten Vetulani et al. (20) :
Sie finden nach 1 - 2 Wochen bzw. 4 - 8 Wochen DMI-Applikation (10 mg/kg/Tag i.p.) 24 h nach der letzten Gabe

1,6 ± 0,4 µg DMI/g bzw. 2,4 µg ± 0,5 µg DMI/g Gewebe.
Van Wijk et al. (56) finden nach 14-tägiger IMI-Applikation (2 x 10 mg/kg/Tag i.p.) 15 min nach Injektion 3,1 ± 0,5 µg IMI und 3,4 ± 0,3 µg DMI/g.
Unser Ergebnis wird auch durch Untersuchungen von Nagy (57) bestätigt :
Er findet an den Tagen 4 - 8 (2 x 10 mg IMI-HCl/kg/Tag - oral) jeweils 8 h nach der letzten Dosis 1,8 µg DMI und 0,21 µg IMI.

Nach Absetzen der Droge fällt der DMI-Spiegel schnell ab : 72 h nach der letzten Applikation ist DMI (und IMI) nicht mehr nachweisbar.

4.4.2. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel nach Vorbehandlung mit Imipramin und 60 min-Inkubation in Cortex und Cerebellum

Innerhalb des pharmakokinetischen Problems schien uns die Aufklärung der Frage wichtig, wie hoch die DMI- und IMI-Konzentration in Gehirnschnitten nach 60 min Inkubation ist, d.h. zu dem Zeitpunkt, an dem die Bildung von cAMP durch Noradrenalin üblicherweise stimuliert wird.
Parallel dazu sollte eine Antwort auf die naheliegende Frage gefunden werden, ob das Fehlen einer signifikanten Subsensitivität noradrenerger Rezeptoren nach längerer Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum unter Umständen auf Veränderungen im Wirkstoffspiegel (im Vergleich zur Cortex) zurückzuführen ist.

Ratten wurden 10 Tage vorbehandelt (siehe 3.4. - Schema 2) und 24 h später decapitiert. Nach Präparation der Gehirne (siehe 3.5.) wurde ein Teil der betreffenden Region eingefroren, das übrige Gewebe einer 60 min-Inkubation (siehe 3.5.) unterworfen.

Die Bestimmung des DMI(IMI)-Spiegels erfolgte nach der Vorschrift von Breyer-Pfaff et al. (40) unter Verwendung siliconisierter Glasgeräte (siehe 3.13).

Das Ergebnis zeigt Tabelle 7 .

Tabelle 7 : Angaben in ng Base/g Feuchtgewicht

		- Inkubation	+ Inkubation
Cortex	DMI	2064,0 ± 599,4 (5)	1177,7 ± 278,7 (5)
	IMI	1082,4 ± 78,9 (6)	219,6 ± 41,9 (6)
Cerebellum	DMI	2235,8 ± 373,9 (4)	936,1 ± 254,6 (3)
	IMI	490,6 ± 29,1 (3)	309,4 ± 37,3 (2)

In beiden Regionen kommt es zu einem deutlichen Abfall des DMI(IMI)-Spiegels. In Bestätigung des Ergebnisses von 4.4.1. sind nach einer 10-tägigen Vorbehandlung mit Imipramin (30 mg/kg/Tag) 24 h später noch 2,1 µg DMI/g vorhanden. Der DMI-Spiegel im Cerebellum liegt mit 2,2 µg/g etwa auf gleichem Niveau.

Inkubiert man das Gewebe - wie in 3.5. beschrieben - 60 min, wird ein beträchtlicher Teil des DMI ausgewaschen.

Dem Ergebnis in 4.4.1. widersprechend, beträgt - nach 10-tägiger Vorbehandlung mit Imipramin und 24 h nach der letzten Applikation - die IMI-Konzentration etwa 1,1 µg/g Cortex-Gewebe.

Für dieses Ergebnis kann außer einer immer wieder auftretenden großen biologischen Streuung bei Experimenten mit Versuchstieren keine weitere Erklärung, insbesondere hinsichtlich der experimentellen Versuchsausführung, angeführt werden.

Werden die Ergebnisse beider Versuchsreihen zusammengenommen, ergibt sich ein IMI-Spiegel nach 10 Tagen Behandlung von 617 ± 160 ng/g Cortex (N=11), der in etwa dem von Nagy (57) berichteten entspricht.

Inkubiert man Cerebellum-Schnitte 60 min lang, sinkt der IMI-Spiegel um etwa 37 % auf 310 ng/g Gewebe.

Nach einer 60 min-Inkubation in Krebs-Ringer-Medium sind die Spiegel von DMI und IMI stark abgesunken. Nimmt man eine homogene Verteilung der Substanzen im Gewebe an, herrschen folgende Konzentrationen :

Cortex	4,62 µM DMI
	0,82 µM IMI
Cerebellum	3,67 µM DMI
	1,15 µM IMI

Angesichts ähnlicher Konzentrationen von DMI und IMI in Cortex und Cerebellum scheint es unwahrscheinlich, daß diese Stoffe in anderen Gehirnstrukturen in einem gänzlich anderen Verhältnis angereichert werden.

4.5. Rückaufnahme von Noradrenalin (Dopamin) in das präsynaptische Axon von Cortex, Cerebellum und Striatum nach Vorbehandlung mit Imipramin

Der weitaus überwiegende Teil der Katecholamine (90 - 95 %) wird nach seiner Freisetzung in den synaptischen Spalt durch einen aktiven Transport-Mechanismus in das präsynaptische Axon zurücktransportiert.
Somit wird einerseits die Wirkungsdauer der Katecholamine begrenzt und andererseits ein Verlust dieser Substanzen aus dem Gehirn vermieden.
Die restlichen 5 - 10 % freien Noradrenalins (Dopamins) im synaptischen Spalt werden - abgesehen von einem kleinen Teil, der durch Abgabe an den Blutkreislauf verloren geht - durch eine relativ unspezifische Katecholamin-O-Methyl-Transferase (KOMT) überwiegend an der 3-OH-Gruppe der Brenzkatechin-Struktur methyliert und damit inaktiviert.
Anfang der sechziger Jahre konnten Axelrod et al. (8,9) eine Hemmung der Rückaufnahme durch Imipramin zeigen. Damit glaubte

man den Wirkungsmechanismus von Antidepressiva gefunden zu haben. Dieser Befund wurde durch die Untersuchungen von Iversen (10), Glowinski und Axelrod (11) und Carlsson et al. (12) bestätigt.
Ross und Renyi (58) fanden die Hemmung der Rückaufnahme durch Imipramin auch in Gehirnschnitten.
Doch war diese Zuversicht verfrüht :
Die Rückaufnahme von Katecholaminen wird schon durch die einmalige Applikation von IMI gehemmt.
So schien es uns wichtig, das Rückaufnahmeverhalten nach längerer IMI-Behandlung zu studieren.

4.5.1. Rückaufnahme von Dopamin und Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin im Striatum

Ratten wurden 9 - 10 Tage mit Imipramin vorbehandelt (Schema 2), 24 h später decapitiert und - wie in 3.14. beschrieben - die Rückaufnahme von Dopamin in das Axon bestimmt. Analog wurde ein 2. Versuch zur Bestimmung der NA-Rückaufnahme durchgeführt.
Die Konzentration der Amine (^{3}H-markiert + unmarkiert) war

für Dopamin $2 \cdot 10^{-8}$ M

für L-Noradrenalin $1 \cdot 10^{-8}$ M

Die Reaktionszeit betrug in beiden Experimenten 2 - 3,5 min ; die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt.

Das Ergebnis ist aus Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 8 : Angaben in fMol DA(L-NA)/mg Protein x min
(Mittelwerte aus Doppelbestimmungen!)

	Kontrollen	9-10 Tage IMI	
Dopamin			
- IMI	190,4 ± 2,4 (3)	197,2 ± 11,3 (3)	n.s.
+ 10^{-6} M IMI	129,6 ± 1,3 (3)	152,1 ± 0,6 (3)	$2P < 0{,}001$
L - Noradrenalin			
- IMI	152,5 ± 19,5 (4)	115,5 ± 14,6 (3)	n.s.
+ 10^{-6} M IMI	97,0 ± 21,9 (4)	92,3 ± 17,4 (3)	n.s.

Von den in 10 ml enthaltenen 200 pMol (^{3}H-)DA wird von unbehandelten Tieren etwa 1/1000 (≙ 190,4 fMol/mg Protein x min) in das präsynaptische Axon transportiert.
Wie erwartet ist die Transportgeschwindigkeit hochsignifikant verringert, wenn zusätzlich 10^{-6} M IMI im Medium ist.
Vorbehandelte Tiere, die nach einer 60 min-Inkubation in Cortex und Cerebellum im Mittel noch etwa 10^{-9} Mol IMI bzw. $4 \cdot 10^{-9}$ Mol DMI/g Gehirnschnitt besitzen (siehe 4.4.2.), zeigen im Vergleich zu den Kontrollen eine unveränderte Rückaufnahme.
Ist zusätzlich noch 10^{-6} M IMI im Medium, wird weniger zurücktransportiert ($2P < 0{,}02$). Dieser Rückgang ist jedoch wesentlich kleiner als beim entsprechenden Kontrollwert.

Der Unterschied zu diesem ist hochsignifikant.

Etwa 1/650 (≙ 152,5 fMol/mg Protein x min) von 100 pMol (^{3}H-)L-NA wird von unbehandelten Ratten in Neuriten von Striatum-Schnitten transportiert.
Ist 10^{-6} M IMI im Medium, nimmt die Geschwindigkeit deutlich, aber auf Grund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant ab. Bei vorbehandelten Tieren ist - im Unterschied zur DA-Rückaufnahme - ein Rückgang des Transports festzustellen.
Der Unterschied zum Kontrollwert ist jedoch ebenfalls wegen hoher Standardabweichungen nicht signifikant.
Dies gilt auch für den mit 10^{-6} M IMI inkubierten Wert.

4.5.2. Rückaufnahme von Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex

In den folgenden Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob die Rückaufnahme von Noradrenalin von der Höhe des DMI(IMI)-Spiegels abhängig ist.

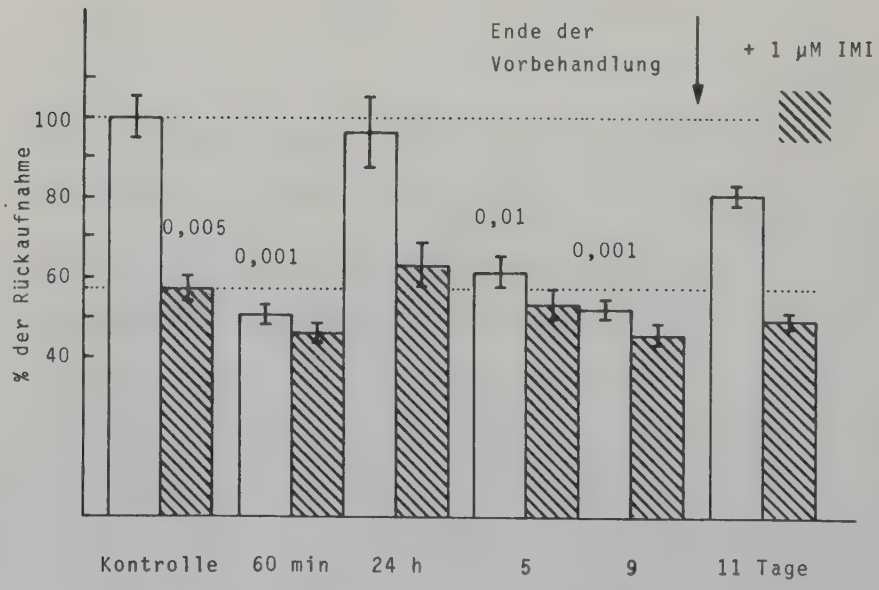
Ratten wurden mit IMI 1 x bzw. 5 oder 9 Tage vorbehandelt, nach 60 min, 24 h, 5, 9, 11 und 14 Tagen decapitiert und die Rückaufnahme bestimmt (siehe 3.14.).
Die (^{3}H-)L-NA-Konzentration betrug $2 \cdot 10^{-8}$ M, die Reaktionszeit 1,5 - 5 min, die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 9 und Abb. 13.

Tabelle 9 : Angaben in fMol L-NA/mg Protein x min
(Mittelwerte aus 2-3 Parallelinkubationen!)

	- IMI	+ 10^{-6} M IMI	
Kontrollen	38,5 ± 2,1 (6)	22,0 ± 1,2 (6)	2P < 0,005
60 min	19,4 ± 1,1 (6)	17,7 ± 1,0 (6)	2P < 0,001
24 h	37,1 ± 3,5 (5)	24,2 ± 1,9 (5)	
5 Tage	23,6 ± 1,6 (5)	20,4 ± 1,4 (5)	2P < 0,01
9 Tage	19,9 ± 0,9 (6)	17,6 ± 1,1 (6)	2P < 0,001
11 Tage	30,9 ± 0,9 (6)	19,0 ± 0,8 (6)	
14 Tage	30,8 ± 1,6 (6)	19,7 ± 0,8 (6)	

Abb. 13 : Rückaufnahme von Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex



Wie erwartet wird durch 10^{-6} M IMI in vitro die Rückaufnahme signifikant gehemmt.

Deutlich ist zu erkennen, daß die Rückaufnahme-Hemmung durch 10^{-6} M IMI in vitro in jedem Fall verstärkt wird. Die mit 10^{-6} M IMI inkubierten Proben von vorbehandelten Tieren unterscheiden sich dabei in keinem Fall signifikant von dem entsprechenden Wert der Kontrolltiere.

24 h nach einer IMI-Gabe, wenn die DMI- und IMI-Spiegel wieder stark abgefallen sind, besteht im Vergleich zu den Kontrollwerten kein Unterschied :

Ist kein IMI zusätzlich im Medium, wird eine Rückaufnahme wie in unbehandelten Kontrollen erhalten. Erfolgt die Inkubation mit 10^{-6} M IMI, wird die Hemmung hochsignifikant.

Nach 5- bzw. 9-tägiger Behandlung mit IMI tritt eine verstärkte Hemmung auf, obwohl jeweils erst 24 h nach Applikation gemessen wurde.

Nach 9 Tagen ist die Hemmung - mit oder ohne 10^{-6} M IMI - ebenso ausgeprägt wie 60 min nach einer IMI-Gabe.

Schon 3 Tage nach der letzten IMI-Gabe ist ein deutlicher Rückgang der Hemmung festzustellen : der Unterschied zum Kontrollwert ist nicht signifikant.

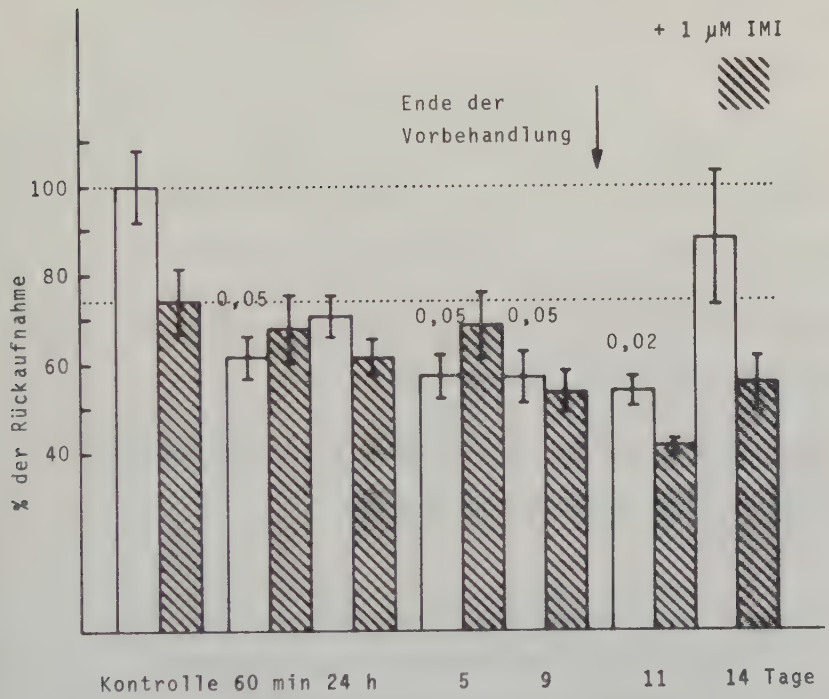
4.5.3. Rückaufnahme von Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum

Die Vorbehandlung und Decapitation der Tiere sowie die Bestimmung der Rückaufnahme erfolgte analog 4.5.2.
Die (^{3}H-)DL-NA-Konzentration betrug $2 \cdot 10^{-8}$ M, die Reaktionszeit 2 - 4 min, die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt. Es wurden immer Cerebella von 2 Ratten für einen Inkubationsansatz verwendet.
Das Ergebnis zeigt Tabelle 10 und Abb. 14.

Tabelle 10 : Angaben in fMol L-NA/mg Protein x min
(Mittelwerte aus je 2 Parallelinkubationen)

	- IMI	+ 10^{-6} M IMI	
Kontrollen	17,2 ± 1,4 (4)	12,8 ± 1,3 (4)	
60 min	10,7 ± 0,8 (3)	11,7 ± 1,3 (3)	$2P < 0,05$
24 h	12,2 ± 0,8 (3)	10,6 ± 0,7 (3)	
5 Tage	9,9 ± 0,9 (3)	11,9 ± 1,3 (3)	$2P < 0,05$
9 Tage	9,8 ± 1,0 (3)	9,3 ± 0,8 (3)	$2P < 0,05$
11 Tage	9,3 ± 0,6 (3)	7,2 ± 0,3 (3)	$2P < 0,02$
14 Tage	15,2 ± 2,6 (4)	9,5 ± 1,1 (4)	

Abb. 14 : Rückaufnahme von Noradrenalin nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum



Auch im Cerebellum wird die Rückaufnahme von Noradrenalin durch 10^{-6} M IMI deutlich gehemmt.
Ebenso unterscheiden sich die 10^{-6} M IMI enthaltenden Inkubationsansätze von vorbehandelten Tieren in keinem Fall signifikant vom entsprechenden Kontrollwert, wenn auch Tendenzen zu verstärkter Hemmung (Tag 11: 60%) zu sehen sind.

60 min nach einer IMI-Applikation ist die Hemmung der Rückaufnahme - wie schon bei der Cortex gesehen - verstärkt.

24 h nach einer IMI-Gabe ist die Hemmung wieder etwas verringert und erreicht den mit 10^{-6} M IMI gehemmten Kontrollwert.

24 h nach 5 bzw. 9-maliger IMI-Gabe verändert sich das Bild nur unwesentlich :

Die Hemmung nimmt zwar zu, ein signifikanter Unterschied - ob mit oder ohne 10^{-6} M IMI - zur mit 10^{-6} M IMI gehemmten Kontrolle besteht jedoch nicht.

Im Gegensatz zur Cortex ist an Tag 11 noch kein Rückgang der Hemmung festzustellen.

Spätestens nach 14 Tagen bzw. 6 Tage nach der letzten IMI-Gabe ist keine signifikante Hemmung der Rückaufnahme von Noradrenalin im Vergleich zur Kontrolle vorhanden.

4.5.4. Rückaufnahme von Noradrenalin in Abhängigkeit der IMI-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex

Weiteren Aufschluß über den Einfluß einer Vorbehandlung mit IMI auf die Rückaufnahme von NA in Gehirnschnitten sollten Untersuchungen bringen, in denen der Grad der Hemmung in Abhängigkeit der in vitro-IMI-Konzentration gemessen wurde.

Ratten wurden 9 Tage mit IMI vorbehandelt, 24 h später decapitiert und - wie in 3.14. beschrieben - die Rückaufnahme

bestimmt.

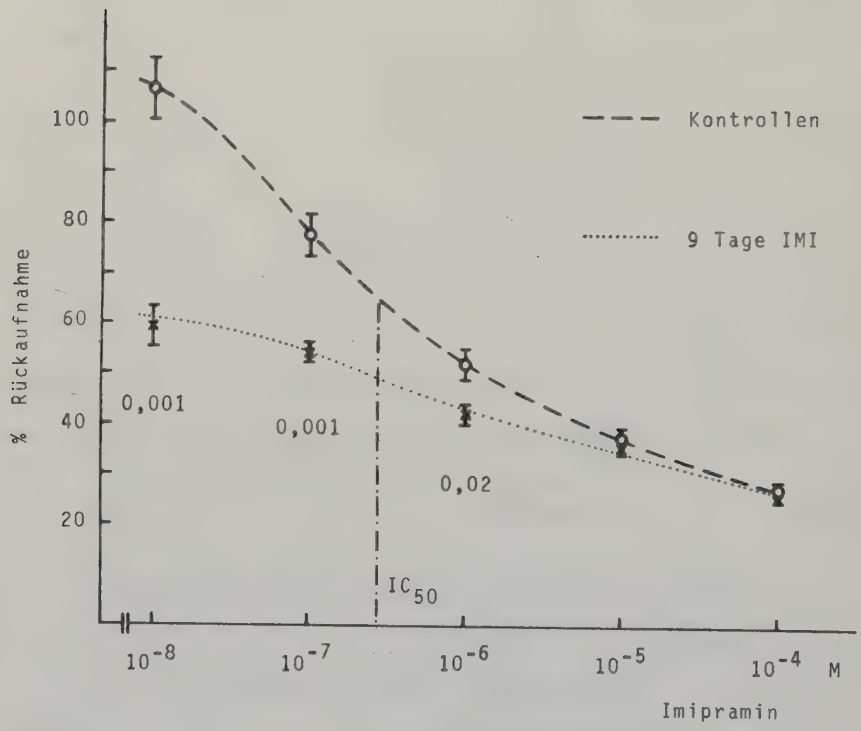
Die Konzentration an (^{3}H-)DL-NA war $2 \cdot 10^{-8}$ M, die Reaktionszeit betrug 3 - 8 min, die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 11 und Abb. 15.

Tabelle 11 : Angaben in fMol L-NA/mg Protein x min

	Kontrollen	9 Tage IMI	
- IMI	29,0 ± 1,2 (4)	20,5 ± 0,7 (7)	2P < 0,001
+ 10^{-8} M IMI	30,9 ± 1,8 (4)	17,3 ± 1,2 (7)	2P < 0,001 (30,9)
+ 10^{-7} M "	22,5 ± 1,2 (4)	15,8 ± 0,5 (7)	2P < 0,001 (22,5)
+ 10^{-6} M "	15,1 ± 0,8 (4)	12,2 ± 0,5 (7)	2P < 0,02 (15,1)
+ 10^{-5} M "	10,9 ± 0,6 (4)	10,4 ± 0,4 (7)	n.s.
+ 10^{-4} M "	8,0 ± 0,4 (4)	7,7 ± 0,4 (7)	n.s.

Abb. 15 : Rückaufnahme von Noradrenalin in Abhängigkeit der Imipramin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin in der Cortex



Wie schon in Abschnitt 4.5.2. gesehen, wird die Rückaufnahme von Noradrenalin nach 9-tägiger Vorbehandlung mit Imipramin hochsignifikant gehemmmt.
Bei einer IMI-Konzentration von 10^{-7} M ist in Schnitten von unbehandelten Tieren eine signifikante Hemmung zu sehen ($2P < 0{,}025$).

In Schnitten von vorbehandelten Tieren ist die Hemmung bei 10^{-7} M IMI im Vergleich zum Kontrollwert von vorbehandelten Tieren noch verstärkt ($2P < 0{,}001$).

Erhöht man die in vitro-IMI-Konzentration weiter auf 1, 10 und 100 µM, nimmt die Hemmung in Schnitten von vorbehandelten Tieren weniger, von unbehandelten Tieren im Verhältnis dazu stärker zu. Die Folge ist eine Konvergenz der Kurven :
Ist der Unterschied in der Hemmung zwischen vor- und unbehandelten Tieren bei 10^{-6} M IMI noch signifikant ($2P < 0{,}02$), ist dies bei 10^{-5} M und 10^{-4} M IMI nicht mehr der Fall. Unabhängig davon, ob die Schnitte von vor- oder unbehandelten Tieren stammen, ist bei etwa 10^{-4} M IMI die maximale Hemmung (- 73%) erreicht.
Der IC_{50}-Wert beträgt für Kontrollen und vorbehandelte Tiere 0,28 µM.

4.5.5. Rückaufnahme von Noradrenalin in Abhängigkeit der Imipramin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum

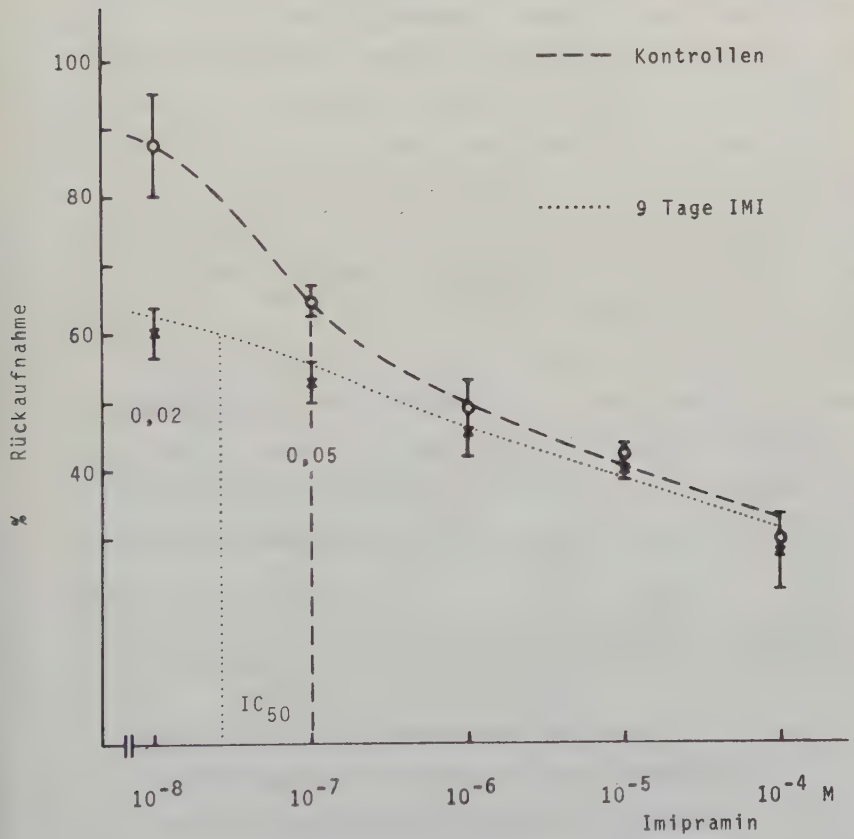
Vorbehandlung und Decapitation der Tiere wie in Abschnitt 3.4. und 3.5. beschrieben.
Die Bestimmung der Rückaufnahme erfolgte wie in Abschnitt 3.14.. Die Konzentration an (^{3}H-)DL-NA war $2 \cdot 10^{-8}$ M, die Reaktionszeit betrug 3 - 8 min, die Proteine wurden nach der Lowry-Methode bestimmt.

Um die Werte mit denen von Abschnitt 4.5.3. vergleichen zu können, wurden alle Angaben durch den in einem Vorversuch ermittelten Faktor 4 dividiert.
Das Ergebnis zeigt Tabelle 12 und Abb. 16.

Tabelle 12 : Angaben in fMol L-NA/mg Protein x min

	Kontrollen	9 Tage IMI	
- IMI	16,5 ± 1,0 (4)	14,0 ± 0,7 (4)	$2P < 0,10$
+ 10^{-8} M IMI	14,4 ± 1,3 (4)	9,9 ± 0,6 (4)	$2P < 0,02$ (14,4)
+ 10^{-7} M "	10,7 ± 0,4 (4)	8,7 ± 0,5 (3)	$2P < 0,05$ (10,7)
+ 10^{-6} M "	8,1 ± 0,7 (4)	7,6 ± 0,7 (4)	n.s.
+ 10^{-5} M "	7,0 ± 0,2 (4)	6,6 ± 0,3 (4)	n.s.
+ 10^{-4} M "	4,9 ± 0,6 (4)	4,6 ± 0,9 (3)	n.s.

Abb. 16 : Rückaufnahme von Noradrenalin in Abhängigkeit der Imipramin-Konzentration nach Vorbehandlung mit Imipramin im Cerebellum



Nach Vorbehandlung mit IMI ist die Rückaufnahme von NA in Cerebellum-Schnitten deutlich, aber nicht signifikant verringert ($2P < 0,10$).

Die in Abschnitt 4.5.3. gefundene, annähernd signifikante Hemmung ($2P < 0,05$) wird jedoch nicht erreicht. Dies ist wahrscheinlich auf die zu geringe Versuchszahl zurückzuführen.

Ein schon bei den Cortex-Schnitten gesehenes Phänomen tritt auch bei den Cerebellum-Schnitten auf :
Werden Schnitte von unbehandelten Tieren mit 10^{-8} M IMI inkubiert, resultiert keine signifikante Hemmung ;
bei Schnitten von vorbehandelten Tieren ist die Folge eine deutliche Hemmung zum entsprechenden Kontrollwert ($2P < 0,005$).

Der Unterschied in der Hemmung zwischen vor- und unbehandelten Tieren ist bei 10^{-8} M und 10^{-7} M annähernd signifikant ($2P < 0,02$ bzw. $2P < 0,05$).
Wird die in vitro-IMI-Konzentration auf 1, 10 und 100 µM erhöht, tritt die schon in der Cortex gesehene Entwicklung ein :

Zunahme der Hemmung (bei unbehandelten Tieren stärker, bei vorbehandelten Tieren schwächer) und Konvergenz der Kurven.
Bei 10^{-4} M IMI wird eine annähernd maximale Hemmung erreicht (- 65%).
Die IC_{50}-Werte sind : für die Kontrollen 0,22 µM
für die vorbehandelten Tiere 0,03 µM.

4.5.6. Kinetik der Rückaufnahme von Noradrenalin in Cortex-Schnitten von unbehandelten und mit Imipramin behandelten Tieren

Veränderungen im Ablauf enzymkatalysierter Reaktionen können hinsichtlich einer Änderung der Affinität des Substrates

zum Enzym und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit experimentell leicht erkannt werden.
Ausgehend von der Hypothese, daß eine langfristige Vorbehandlung mit IMI ein bestimmtes, an der Membran des präsynaptischen Axons in den Transportmechanismus eingreifendes Enzym(Protein) beeinflußt haben könnte, wurde der Versuch unternommen, Änderungen an oben genannten Parametern quantitativ zu erfassen.

Ratten wurden 9 Tage mit IMI vorbehandelt (Schema 2), 24 h später decapitiert und die Rückaufnahme bestimmt (siehe 3.14.). Die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt.
Die Reaktionszeit betrug 3 - 5,5 min.

Von 3 Gruppen wurde die Kinetik gemessen :

Gruppe 1 : mit IMI vorbehandelte Tiere (N=6)

Gruppe 2 : unbehandelte Tiere (N=6)

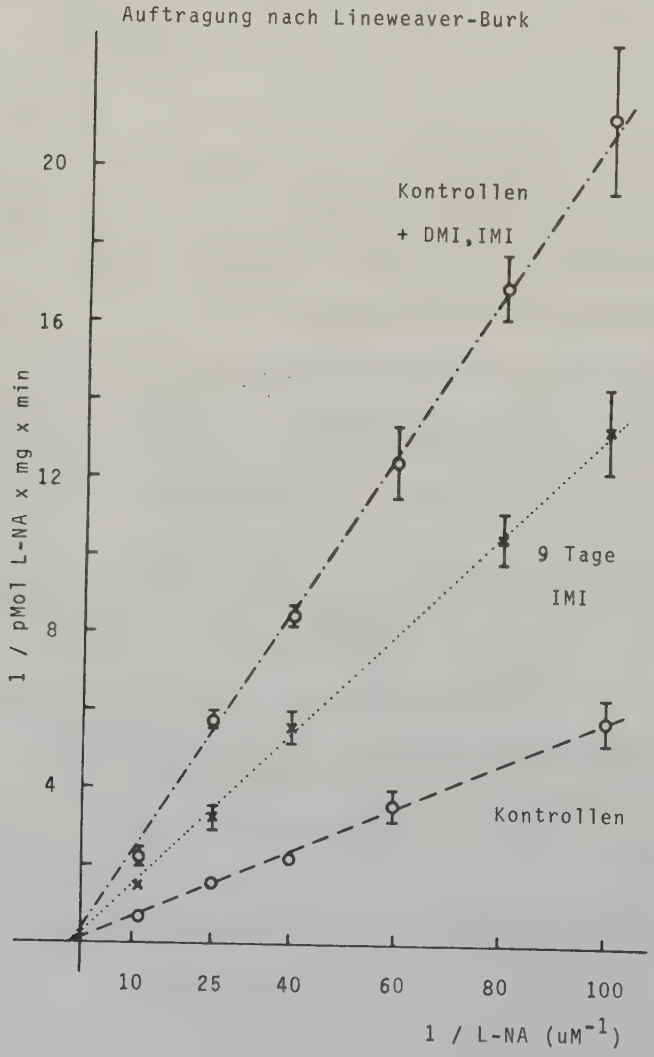
Gruppe 3 : unbehandelte Tiere (N=6) :
10 min vor der Reaktion wurden DMI und IMI dem Inkubations-Medium zugesetzt.
Die Endkonzentrationen betrugen wie in Abschnitt 4.4.2. gefunden : DMI 4,62 µM
IMI 0,82 µM

Die Endkonzentrationen von (^{3}H-)L-NA waren :

$1{,}001 \cdot 10^{-8}$ M	$2{,}501 \cdot 10^{-8}$ M
$1{,}251 \cdot 10^{-8}$ M	$4{,}00 \cdot 10^{-8}$ M
$1{,}676 \cdot 10^{-8}$ M	$9{,}89 \cdot 10^{-8}$ M

Das Ergebnis zeigt Abb. 17.

Abb. 17 : Kinetik der Rückaufnahme von Noradrenalin in Cortex-Schnitten von unbehandelten und mit Imipramin behandelten Tieren



Die Geraden wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes („lineare Regression") berechnet ; der Korrelationskoeffizient r ist jeweils > 0,999 !

Die Unterschiede zwischen den Meßwerten der 3 Geraden sind bei

$9{,}89 \cdot 10^{-8}$ M L-NA — signifikant ($2P < 0{,}05$)

bzw. hoch signifikant ($2P < 0{,}001$)

bei allen anderen Konz. — hoch signifikant ($2P < 0{,}001$, $0{,}005$)

Vergleich der Kinetik-Charakteristika :

	Kontrolle	Kontrolle (+ DMI,IMI)	9 Tage IMI
K_M µM	1,473	0,8721	1,144
v_{max} (min^{-1})	1,1836	0,5467	0,6681

Wie erwartet wird durch eine Vorbehandlung mit IMI die Rückaufnahme von Noradrenalin in Cortex-Schnitten hochsignifikant gehemmt.
Während die K_M-Werte in etwa gleich bleiben, nimmt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit im Sinne einer nicht-kompetitiven Hemmung deutlich ab.

Bei der 2. Kontrollgruppe, deren Schnitte mit DMI und IMI in gefundener Konzentration inkubiert wurden, sind sowohl

Michaelis-Konstante als auch maximale Reaktionsgeschwindigkeit verringert.
Dies deutet auf einen gemischten Hemmtyp hin.
Andererseits besteht bei Verringerung der in vitro-DMI- und IMI-Konzentrationen die Möglichkeit, daß die Geraden der Gruppen 1 und 3 zusammenfallen.

4.6. Spontane motorische Aktivität nach Vorbehandlung mit Imipramin

Das Enzym Tyrosin-Hydroxilase katalysiert in der Biosynthese der Katecholamine die Hydroxilierung der Aminosäure L-Tyrosin in 4-Stellung des Benzolrings zu L-Dopa.
Dieser Schritt wurde als geschwindigkeitsbestimmend für die Synthese erkannt (59).
Skolnick und Daly (60) konnten unter Einbeziehung von 4 Rattenstämmen eine positive Korrelation zwischen NA-stimulierter cAMP-Bildung in der Cortex und der Tyrosin-Hydroxilase-Aktivität im Striatum bzw. Mittelhirn demonstrieren.
Weiter beschrieben sie eine negative Korrelation zwischen spontaner (Verhaltens-)Aktivität und NA-stimulierter cAMP-Bildung in der Cortex.

Es ist auch bekannt, daß chronische DMI-Applikation in mehreren Regionen des Rattengehirns eine Verringerung der

Tyrosin-Hydroxilase-Aktivität (61) und der Umsatzrate von NA und Serotonin zur Folge hat (62).

So schien uns - vor allem im Hinblick auf die nach längerer IMI-Vorbehandlung auftretende verringerte NA-stimulierte cAMP-Bildung bzw. Subsensitivität noradrenerger Rezeptoren in der Cortex - die Messung der spontanen motorischen Aktivität - wie in 3.15. beschrieben - vor, während und nach IMI-Applikation interessant.

Die IMI-Vorbehandlung wurde nach Schema 1 durchgeführt :

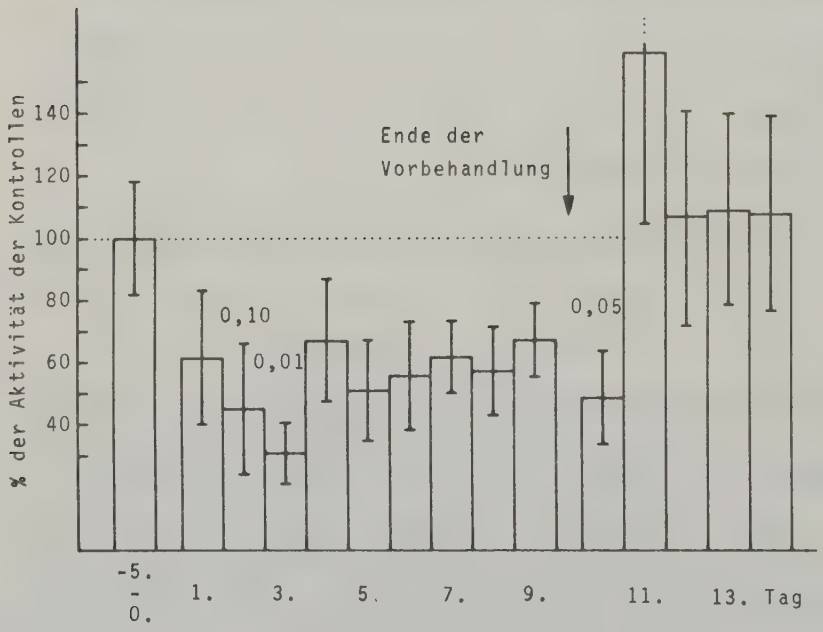
Tag 1 - 3 : 50 mg/kg/Tag
Tag 4 - 9 : 30 mg/kg/Tag

Das Ergebnis zeigt Tabelle 13 und Abb. 18.

Tabelle 13 : Angaben in % der Aktivität der Kontrolltiere

Tag	%	
- IMI (-5 - 0)	100.0 ± 18,6 (6)	
1	61,7 ± 21,7 (5)	
2	45,5 ± 21,2 (5)	$2P < 0,10$
3	31,2 ± 10,1 (5)	$2P < 0,01$
4	66,8 ± 19,9 (5)	
5	51,0 ± 16,2 (5)	
6	55,8 ± 17,3 (5)	
7	61,9 ± 11,8 (5)	
8	57,3 ± 14,3 (5)	
9	67,4 ± 12,0 (5)	
10	48,8 ± 15,2 (5)	$2P < 0,05$
11	159,1 ± 55,5 (5)	
12	106,5 ± 34,6 (5)	
13	108,7 ± 31,0 (5)	
14	107,5 ± 31,5 (5)	

Abb. 18 : Spontane motorische Aktivität nach Vorbehandlung mit Imipramin



Schon nach einmaliger IMI-Applikation ist eine gewisse, wenn auch nicht signifikante Verringerung der motorischen Aktivität zu sehen, obwohl die Messung erst 13 - 14 h nach dieser Dosis erfolgte.

Dieser „Dämpfungs"-Effekt verstärkt sich an Tag 2 noch weiter und wird an Tag 3 signifikant ($2P < 0{,}01$).

Eine Gewöhnung ist an Tag 4, dem ersten Tag mit auf 30 mg/kg verringerter Dosis, zu beobachten. An den Tagen 5 - 9 ist trotz weiterer IMI-Applikation zwar eine deutliche Tendenz zu verminderter spontaner motorischer Aktivität zu sehen, die Signifikanzschwelle wird aber nicht erreicht.
An Tag 10 - 38 h nach der letzten Dosis - sind die Tiere noch deutlich gedämpft.
Zum Zeitpunkt der Messung ist der DMI-Spiegel (unter Einbeziehung einer Halbwertszeit von 18 h) auf etwa 2,2 µg/g Gewebe gesunken. Dies sind 4/5 der an Tag 10 vormittags 8 - 10 Uhr herrschenden Konzentration in der Cortex.
An Tag 11 kommt es zu einem nicht signifikanten „overshoot"-Effekt :
24 h später, 3 Tage nach der letzten IMI-Dosis, zeigen die Tiere wieder „normale" spontane motorische Aktivität.

4.7. Noradrenalin(Dopamin)-stimulierte cAMP-Bildung und Noradrenalin(Dopamin)-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES in Cortex und Striatum

Schon vor etwa 20 Jahren vermuteten Brodie et al. (63) eine gewisse, wenn auch noch unbestimmte Beziehung zwischen Verhalten und biogenen Aminen im Gehirn.

Schildkraut erklärte in seiner bekannten Hypothese die durch Verlust des Antriebs, der Dynamik, der Entscheidungsfähigkeit und einem Zustand von gedrückter Stimmung charakterisierte Depression mit einer Störung im Haushalt biogener Amine.

α -Methyl-p-Tyrosin (AMPT) blockiert die Katecholamin-Biosynthese, indem es das Enzym Tyrosin-Hydroxilase hemmt (59). Die Folge ist eine Verarmung der NA-, besonders aber der DA-Speicher (64). Mehrere Autoren (65-67) konnten zudem eine nach AMPT-Gabe auftretende Sedierung und gewisse depressive Symptome zeigen.

Von p-Chlor-Phenylalanin (PCPA), einem potenten Inhibitor der Tryptophan-Hydroxilase bzw. der Serotonin-Biosynthese, ist ebenfalls bekannt, daß es Depressionen auslösen kann. Friedman et al. (68) konnten in ihren Untersuchungen an Patienten mit depressiven Symptomen zeigen, daß PCPA - nicht aber AMPT - die antidepressive Wirkung von IMI aufhebt.

In weiterführenden Untersuchungen an Ratten konnten sie die Hypothese einer überwiegenden Beteiligung serotoninerger Neuronen an der antidepressiven Wirkung von IMI erhärten. Sie zeigten, daß eine Kombination IMI + PCPA die durch PCPA allein bewirkte Entleerung der Serotonin-Speicher bzw. den Abfall der 5-Hydroxi-indolessigsäure-Konzentration im Gehirn stärker hemmen konnte, als dies eine Kombination IMI + AMPT bei der durch AMPT ausgelösten Verarmung der NA(DA)-Speicher vermochte.

Von dem in den intraneuronalen Speichermechanismus durch Blockierung des NA(DA, Serotonin)-Transports vom cytoplasma-

tischen Speicher in den Reserve-Speicher eingreifenden Reserpin (RES) ist bekannt, daß es - wahrscheinlich durch den intraneuronal drastisch verringerten Katecholamin-Gehalt (69,70) - depressive Symptome erzeugen kann (71).
Von IMI bzw. DMI ist bekannt, daß es die Rückaufnahme von NA, DA und Serotonin hemmt (vgl. 4.5.1.-6. - (11)) und wahrscheinlich die Umsatzrate von Katecholaminen beeinflußt (62, 72,73).
So schien es interessant, den Einfluß einer längeren Vorbehandlung von Ratten mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES auf die NA(DA)-stimulierte cAMP-Bildung und auf den Gehalt an Noradrenalin und Dopamin in Cortex und Striatum zu untersuchen.

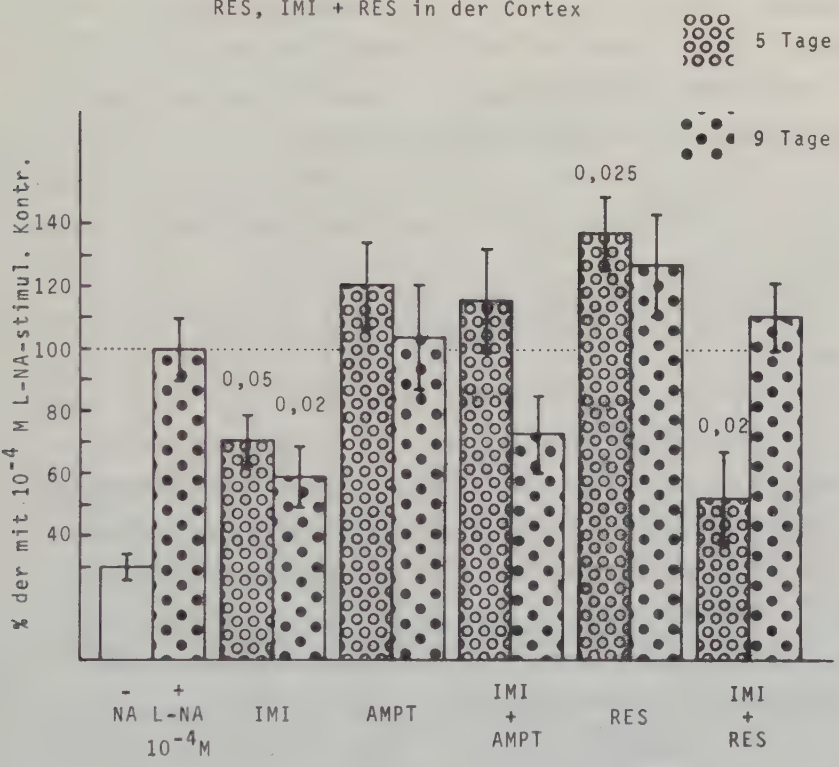
4.7.1. Noradrenalin(Dopamin)-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES in Cortex und Striatum

Ratten wurden 5 oder 9 Tage vorbehandelt (siehe 3.4.) und 24 h später zum Versuch eingesetzt.
Die Präparation und Inkubation der Gehirnschnitte erfolgte analog 3.5.
Die End-Konzentration an L-NA betrug 10^{-4} M, die Stimulationszeit 10 min.
Die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt.
Das Ergebnis zeigt Tabelle 14 und Abb. 19.

Tabelle 14 : Angaben in pMol cAMP/mg Protein x 10 min

		- NA	+ 10^{-4} M L-NA	
Kontrollen		11,7 ± 1,5 (11)	38,9 ± 3,8 (11)	
IMI	5 Tage	14,0 ± 1,4 (9)	27,6 ± 3,3 (9)	2P < 0,05
	9 Tage	14,1 ± 2,3 (9)	23,0 ± 3,9 (9)	2P < 0,02
AMPT	5 Tage	20,1 ± 5,9 (8)	47,2 ± 5,5 (8)	n.s.
	9 Tage	7,7 ± 1,0 (8)	40,5 ± 6,7 (8)	n.s.
IMI + AMPT	5 Tage	12,6 ± 1,8 (7)	45,2 ± 6,6 (7)	n.s.
	9 Tage	8,4 ± 1,4 (8)	28,5 ± 5,0 (8)	n.s.
RES	5 Tage	14,7 ± 2,4 (10)	53,7 ± 4,5 (10)	2P < 0,025
	9 Tage	7,9 ± 0,7 (11)	49,7 ± 6,3 (11)	n.s.
IMI + RES	5 Tage	8,8 ± 0,8 (8)	20,5 ± 5,6 (8)	2P < 0,02
	9 Tage	15,0 ± 1,2 (7)	43,3 ± 4,4 (8)	n.s.

Abb. 19 : Noradrenalin-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES in der Cortex



Eine Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES bewirkt keine signifikante Änderung der Basalwerte gegenüber dem Kontrollwert von 11,7 ± 1,5 pMol cAMP/mg Protein. Eine langfristige IMI-Applikation bewirkt die bekannte (vgl. 4.1. bzw. (21)) Verringerung der NA-stimulierten cAMP-Bildung (-30 % - $2P < 0,05$).

5 oder 9 Tage Vorbehandlung mit AMPT (200 mg/kg/Tag) allein beeinflußt die NA-stimulierte cAMP-Bildung nicht wesentlich, wenn auch eine geringe Tendenz zu größerer Stimulation erkennbar ist.

In der Kombination AMPT + IMI wird jedoch ein starker Einfluß des Tyrosin-Hydroxilase-Inhibitors sichtbar :

Nach 5 Tagen ist die NA-stimulierte cAMP-Bildung nicht mehr reduziert, sondern im Vergleich zum Kontrollwert eher verstärkt (nicht signifikant).

Dieser Umkehreffekt tritt jedoch nach 9 Tagen Vorbehandlung nicht ein :

Die cAMP-Bildung ist etwa ebenso stark reduziert wie jene nach 5 Tagen IMI-Vorbehandlung (nicht signifikant).

5 und 9 Tage Vorbehandlung mit RES bewirkt eine deutliche Supersensitivität noradrenerger Rezeptoren. Diese ist vor allem an Tag 6 ausgeprägt ($2P < 0{,}025$).

RES in Kombination mit IMI hebt in ähnlicher Weise wie AMPT die Subsensitivität noradrenerger Rezeptoren teilweise auf.

Im Gegensatz zur Kombination AMPT + IMI ist jedoch der Zeitpunkt der Umkehr vertauscht :

5 Tage RES + IMI-Applikation bewirkt eine im Vergleich zum 9 Tage-IMI-Wert sehr ähnliche Verringerung der cAMP-Bildung ($2P < 0{,}02$).

Eine 9-tägige Vorbehandlung mit RES + IMI scheint dagegen auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung wenig Einfluß auszuüben.

In einem analogen Versuch wurde die DA(NA)-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES im Striatum untersucht.
Auf eine Wiedergabe und Interpretation der Ergebnisse wird verzichtet, da zwar Tendenzen zu veränderter DA(NA)-stimulierter cAMP-Bildung zu sehen sind, signifikante Unterschiede jedoch in keinem Fall auftraten.

4.7.2. Noradrenalin(Dopamin)-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES in Cortex und Striatum

Ratten wurden 5 oder 9 Tage vorbehandelt (siehe 3.4.) und 24 h später zum Versuch eingesetzt.
Die Extraktion und Bestimmung von Noradrenalin erfolgte nach 3.16.. Das Ergebnis zeigt Tabelle 15.

Tabelle 15 : Angaben in ng NA/g Feuchtgewicht

Kontrollen		624,4 ± 80,6 (13)	
IMI	5 Tage	276,7 ± 48,9 (6)	$2P < 0,02$
	9 Tage	466,7 ± 147,1 (6)	n.s.
AMPT	5 Tage	339,5 ± 68,1 (6)	$2P < 0,05$
	9 Tage	364,8 ± 69,9 (9)	$2P < 0,05$
IMI + AMPT	5 Tage	309,0 ± 82,2 (6)	$2P < 0,05$
	9 Tage	377,6 ± 30,9 (7)	$2P < 0,05$
RES	5 Tage	329,0 ± 64,0 (9)	$2P < 0,02$
	9 Tage	316,9 ± 43,1 (10)	$2P < 0,01$
IMI + RES	5 Tage	437,3 ± 45,7 (8)	n.s.
	9 Tage	436,4 ± 74,4 (8)	n.s.

In unbehandelten Tieren beträgt der NA-Spiegel 624,4 ng/g Feuchtgewicht und ist damit in Übereinstimmung mit Literaturwerten.

Nach 5-maliger IMI-Applikation ist die NA-Konzentration signifikant gesunken ($2P < 0,02$).

Nach 9 Tagen Vorbehandlung ist der NA-Spiegel zwar noch deutlich erniedrigt, ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle besteht aber nicht.

Wie erwartet verursacht AMPT eine Senkung der NA-Konzentration im präsynaptischen Axon :

Nach 5 bzw. 9 Tagen Vorbehandlung sind die Spiegel signifikant gefallen (je $2P < 0,05$).

Eine Kombination IMI + AMPT kann die NA-Verarmung nicht verhindern : die NA-Konzentration ist im Vergleich zu den Werten nach AMPT-Vorbehandlung beinahe unverändert.

5 oder 9-tägige Vorbehandlung mit RES hat im Vergleich zu AMPT einen stärkeren Einfluß auf die Entleerung der NA-Speicher : Nach 5 Tagen beträgt der Verlust -47 % ($2P < 0,02$), nach 9 Tagen -49 % ($2P < 0,01$).

Im Gegensatz zur Kombination IMI + AMPT kann eine Vorbehandlung von Ratten mit RES + IMI die NA-Speicher vor Entleerung teilweise schützen. Der Unterschied zur Kontrolle beträgt zu beiden Zeitpunkten nur noch 30 % (n.s.).

In einem analogen Versuch wurden die Dopamin-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES im Striatum untersucht.
Auf eine Wiedergabe und Interpretation der Ergebnisse wird verzichtet, da - selbst nach Vorbehandlung mit AMPT - in keinem Fall signifikante Unterschiede zum Kontrollwert auftraten. Weite Streuung der Mittelwerte (u.a. durch kleine Gewebemassen bedingt) ließen kaum Tendenzen zu eventuell stattgefundenen Veränderungen erkennen.

5. DISKUSSION

5.1. Noradrenalin-stimulierte cAMP-Bildung

Die in Cortexschnitten in Abhängigkeit der L-NA-Konzentration verringerte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit IMI läßt eine nicht-kompetitive Hemmung postsynaptischer Rezeptoren durch IMI (DMI) als möglich erscheinen. Es ist aber bekannt, daß erst relativ hohe IMI(DMI)-Konzentrationen im synaptischen Spalt zu einer Blockade der cAMP-Bildung oder der präsynaptischen α-Rezeptoren führen.

Eine erhöhte PDE-Aktivität im postsynaptischen Neuron konnte nicht beobachtet werden (74). Die durch Noradrenalin stimulierbare Adenylatcyclase war nach Vorbehandlung mit IMI - bei unveränderter Basalaktivität - nur noch zu 75 % aktivierbar (74).

Angesichts der offensichtlich verringerten Stimulierbarkeit bzw. erhaltenen Affinität rückt daher eine andere Interpretation in den Vordergrund :
Die nach Vorbehandlung mit IMI(DMI) infolge der Rückaufnahme-Hemmung auftretenden höheren Transmitter-Konzentrationen im synaptischen Spalt führen reflektorisch zu einer Verringerung der Zahl der NA-sensitiven Rezeptoren (75). Dabei wäre es möglich, daß ein gewisser Teil der Rezeptoren (40 - 60 %) durch

das „Überangebot" an NA (und Anwesenheit von DMI, IMI ?) in ihrer Konformation so verändert sein könnte, daß NA nicht mehr als „first messenger" erkannt wird („Internalization").

Andererseits könnten aber die Rezeptoren im Rahmen des normalen Rezeptor-turnover auch vollständig abgebaut werden. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen von Banerjee et al. (76) unterstützt. Sie fanden nach 6-wöchiger Vorbehandlung mit DMI (10 mg/kg/Tag i.p.) in der rohen Mikrosomen-Fraktion des Hirnhomogenats von Ratten eine Reduktion der spezifischen Bindung des ß-Antagonisten Dihydroalprenolol um etwa 65 % !

Eine nach Ende der Vorbehandlung mit IMI zu fordernde Normalisierung der ursprünglichen Empfindlichkeit oder Zahl der noradrenergen Rezeptoren trat in unseren Versuchen zutage. An Tag 13, 4 Tage nach Absetzen der Droge, erreichten die cAMP-Spiegel wieder ihre normale Höhe.

Im Cerebellum war die NA-stimulierte cAMP-Bildung nach Vorbehandlung mit IMI nur tendenziell, nicht aber signifikant reduziert. Dies steht im Widerspruch zu elektro-physiologischen Untersuchungen von Siggins und Schultz (77), die an den NA-sensitiven Purkinje-Zellen des Kleinhirns demonstrieren konnten, daß eine 6 - 10-tägige Vorbehandlung mit DMI 1.) die Feuerungsrate dieser Zellen um etwa 75 % verringert und 2.) die NA-empfindlichen Rezeptoren der Purkinje-Zellen subsensitiv macht. 5 Tage nach Absetzen der Droge „feuerten" die Purkinje-Zellen wieder normal.

Ein Grund für diese Diskrepanz könnte in der sehr spezifischen Erfassung der Purkinje-Zellen, die nur etwa 5 % der Zellmasse des Kleinhirns ausmachen, durch die von Bloom und Siggins entwickelte Technik liegen.

Die Stimulierbarkeit dopaminerger und noradrenerger Rezeptoren im Striatum befindet sich in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Forn et al. (26). Ob die auch nach längerer Vorbehandlung mit IMI unveränderte Stimulierbarkeit dopaminerger und (oder) noradrenerger Rezeptoren im Striatum seine Ursache in erheblich niedrigeren „steady-state"-Spiegeln von DMI(IMI) hat, müssen weitere Experimente zeigen.

Die Nicht-Beeinflussung der Reversibilität der Subsensitivität noradrenerger Rezeptoren durch Chloramphenicol unterstützt die angeführte Hypothese einer durch Überflutung mit NA bedingten Konformationsänderung noradrenerger Rezeptoren. Wäre nämlich der nach Absetzen der Droge einsetzende Anstieg der cAMP-Bildung Folge einer de Novo-Synthese von Rezeptorprotein, würde diese durch Chloramphenicol gehemmt bzw. eine Reversibilität wäre nicht so schnell zu beobachten.
Allerdings muß einschränkend gesagt werden, daß eine tatsächliche Messung des Ausmasses der Proteinbiosynthese-Hemmung nicht vorgenommen wurde.

5.2. Imipramin- und Desmethylimipramin-Spiegel

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Nagy (57) sind biochemische und pharmakologische Wirkungen von IMI bei Ratten nach mehrmaliger oraler Verabreichung fast ausschließlich auf den Hauptmetaboliten DMI zurückzuführen.
3 Tage nach Absetzen der Droge ist DMI(und IMI) in der Cortex nicht mehr nachzuweisen.
Eine 60 min-Inkubation, wie sie im Rahmen dieser Arbeit auch zur Bestimmung der L-NA(DA)-stimulierten cAMP-Bildung (nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES) und der Rückaufnahme zur Anwendung gelangte, bewirkt eine erhebliche Senkung (-37 bis -80 %) der DMI(IMI)-Konzentration in Cortex und Cerebellum.

Bei den hier dargestellten Untersuchungen, denen eine 60 min-Inkubation vorangeht, sind daher folgende Konzentrationen - eine gleichmäßige, nicht kompartimentalisierte Verteilung der Pharmaka vorausgesetzt - zugrunde zu legen :

Cortex	4,62 µM DMI
	0,82 µM IMI
Cerebellum	3,67 µM DMI
	1,15 µM IMI

5.3. Rückaufnahme

Angesichts der nach Vorbehandlung mit IMI im Striatum beobachteten, unveränderten Stimulierbarkeit dopaminerger und noradrenerger Rezeptoren würde man in vivo und in vitro keine Hemmung der Rückaufnahme von DA und NA erwarten.
Dies war bei den mit IMI 9 - 10 Tage vorbehandelten Tieren ohne 10^{-6} M IMI in vitro tatsächlich der Fall. Bei den mit 10^{-6} M IMI inkubierten Striatumschnitten ist jedoch die Rückaufnahme gehemmt.
Bei Noradrenalin ist die Hemmung - durch hohe Standardabweichungen bedingt - nicht signifikant. Im Gegensatz dazu, wurde die DA-Rückaufnahme durch 10^{-6} M IMI in vitro hochsignifikant gehemmt.
Dies wird auch von anderen Autoren berichtet:
Hyttel (78) demonstriert an einer striatalen Synaptosomen-Fraktion von Ratten IC_{50}-Werte von 18 µM für IMI und 9,1 µM für DMI. Halaris et al. (79) zeigen an einer Ganzhirn-Synaptosomen-Präparation, daß 10 µM IMI die DA-Rückaufnahme zu 30 % hemmt. Eine gleichstarke Hemmung mit 1 µM IMI in Striatum-Schnitten erscheint somit möglich.

Die Tatsache, daß in Striatum-Schnitten von IMI-vorbehandelten Tieren keine Rückaufnahme-Hemmung zu erkennen ist bzw. mit 10^{-6} M IMI in vitro eine Hemmung - zumindest bei DA - demonstriert werden kann, würde die angeführte Hypothese eines erheblich niedrigeren DMI(IMI)-Spiegels im Striatum unterstützen.

Ungeklärt bleibt jedoch die Tatsache, daß bei vorbehandelten Tieren die DA-Rückaufnahme durch 10^{-6} M IMI in vitro im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant weniger gehemmt wird.

Eine Hemmung der Rückaufnahme von NA in der Cortex nach Vorbehandlung mit IMI ist vom IMI-Spiegel in vivo unabhängig :

60 min nach einmaliger Applikation bzw. 24 h nach neunmaliger Applikation ist die Hemmung ebenso ausgeprägt, obwohl die Spiegel sehr differieren.

Dagegen ist ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Hemmungsgrad und DMI-Konzentration in vivo sehr wahrscheinlich :

24 h nach einmaliger Applikation, wenn der DMI-Spiegel auf 920 ng/g gesunken ist, ist keine signifikante Hemmung zu beobachten. 60 min nach Applikation bzw. 24 h nach 5-oder 9-maliger Gabe (hohe DMI-Spiegel) ist die Hemmung hochsignifikant. Weiter wird dieser Einfluß durch den an Tag 12 auftretenden Rückgang der Hemmung deutlich. Synchron dazu ist an Tag 12 kein DMI mehr nachweisbar.

Es gibt aber Argumente, die gegen eine derartige „umgekehrte Proportionalität" zwischen NA-Rückaufnahme-Hemmung und DMI-Konzentration in vivo sprechen :

Es ist bekannt (80), daß DMI im Vergleich zu IMI die NA-Rückaufnahme stärker blockiert, während IMI spezifischer die Serotonin-Rückaufnahme hemmt.

Eine Folge davon sollte sein, daß angesichts der an Tag 10 nach einer 60 min-Inkubation im Vergleich zu IMI etwa 6-mal höheren DMI-Konzentration (4,62 µM DMI - 0,82 µM IMI) die Hemmung

der NA-Rückaufnahme im Vergleich zur mit 10^{-6} M IMI bewirkten Hemmung wesentlich verstärkt wird. Dies ist jedoch nicht der Fall. Weiter ist nach 9 Tagen - im Vergleich zu Tag 6 - eine deutliche, jedoch nicht signifikante Tendenz zu größerer Hemmung zu beobachten, obwohl die DMI-in vivo-Spiegel an Tag 10 nicht höher sind.

Als entscheidendes Kriterium für die Stärke der Hemmung ist die freie Wirkstoffkonzentration des hemmenden Pharmakons an der präsynaptischen Membran anzusehen. Der Widerspruch könnte - durch die unterschiedliche Lipophilie von DMI und IMI bedingt - auf eine inter(intra)neuronal unterschiedliche Verteilung bzw. Bindung an „Kompartimente" zurückzuführen sein.
Die Konzentrationen direkt am Wirkort scheinen also noch wesentlich geringer als die nach 60 min Inkubation gefundenen zu sein :

$$\underline{\text{IMI} \blacktriangleleft \text{DMI} \blacktriangleleft 10^{-6}\ \text{M}\ !}$$

Beim Cerebellum scheint die Eliminationsgeschwindigkeit von DMI - im Vergleich zur Cortex - deutlich verringert zu sein :
24 h nach einmaliger IMI-Gabe ist die NA-Rückaufnahme noch wesentlich gehemmt. Diese These wird durch die noch an Tag 12 anhaltende, signifikante Hemmung unterstützt. Die nach 60 min und an Tag 6 beobachtete, statistisch noch nicht signifikante, aber doch deutlich verringerte Hemmung bei

10^{-6} M IMI in vitro ist wahrscheinlich auf die zu geringe Versuchszahl zurückzuführen.

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Rückaufnahme von NA in Abhängigkeit der IMI-Konzentration in Schnitten von Cerebellum und Cortex bestätigen angeführte Hypothese :

10^{-7} M IMI (Cerebellum: 10^{-8} M) verstärken hochsignifikant die Hemmung der NA-Rückaufnahme bei IMI-vorbehandelten Tieren. Eine eindeutige Bestimmung des Hemmtyps aus den beiden Dosis-Wirkungs-Kurven ist nicht möglich, da die IC_{50}-Werte und die Hemmgeschwindigkeiten jeweils verschieden sind.

Das Kinetik-Experiment konnte jedoch diese Frage weitgehend aufklären :
Auf Grund der kleineren v_{max} bzw. etwa gleichen K_M-Werte ist eine nicht-kompetitive Hemmung wahrscheinlich.
Die Nicht-Übereinstimmung der Geraden von Gruppe 1 und 3 (IMI-vorbehandelte Tiere - Kontroll-Tiere + 4,62 µM DMI, 0,82 µM IMI) im Lineweaver-Burk-Diagramm ist möglicherweise auf die zu hohe DMI(IMI)-in vitro-Konzentration bzw. zu hohen Konzentrationen an der präsynaptischen Membran zurückzuführen.

5.4. Motorische Aktivität

Die an Tag 3 eintretende signifikante Dämpfung könnte sich aus der bis zu diesem Zeitpunkt höheren Dosis von 50 mg/kg/Tag erklären. An allen weiteren Tagen wurde nicht annähernd eine derartige Verringerung spontaner Bewegungen beobachtet.
Der an Tag 11 zu beobachtende „overshoot" ist wahrscheinlich Folge der durch chronische IMI- bzw. DMI-Applikation verursachten Verringerung der Tyrosin-Hydroxilase-Aktivität bzw. des NA-turnover (61,62).
Eine Verringerung der präsynaptischen NA-Aktivität verursacht postsynaptisch Supersensitivität (81 - 83).

5.5. Noradrenalin-stimulierte cAMP-Bildung und Noradrenalin-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT, IMI + AMPT, RES, IMI + RES

DMI(IMI)-Applikation über längere Zeit führt zu einer signifikanten Verringerung der cAMP-Bildung in postsynaptischen Neuronen der Cortex (20, 21).
Die Ursache ist eine Rückaufnahme-Hemmung von NA durch IMI bzw. DMI. Die hohe Transmitter-Konzentration im synaptischen Spalt führt wahrscheinlich durch Rückkopplungs-Hemmung zu einem

Abfall der „steady-state"-NA-Konzentration im präsynaptischen Neuron.

Dies wird durch Untersuchungen von Schildkraut et al. (72) und Roffler-Tarlov (24) bestätigt, die nach 10 - 21 Tagen IMI-Applikation bzw. 4 Wochen DMI-Applikation einen verringerten NA-Spiegel beobachteten.
Da zu diesen Zeitpunkten - nach oraler Verabreichung - fast ausschließlich DMI im Gehirn vorhanden ist, kann dieser Effekt dem Desmethyl-Derivat zugeschrieben werden.
Im Gegensatz zum hier angeführten Ergebnis stehen jedoch Untersuchungen von Friedman et al. (68). Sie sehen nach IMI-Verabreichung keine Beeinträchtigung des präsynaptischen NA-Spiegels. In Bestätigung der Untersuchungen von Friedman et al. ist nach 9 Tagen IMI-Vorbehandlung der NA-Gehalt nicht signifikant verringert. Eine Erklärung für diese Diskrepanz kann nicht gegeben werden.

Infolge der Hemmung der Synthese bzw. des verringerten NA-Spiegels kann AMPT zu keinem Anstieg der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt führen. Damit übereinstimmend ist die NA-stimulierte cAMP-Bildung nicht wesentlich verändert, wenn auch eine Tendenz zu höheren Konzentrationen sichtbar wird.
Die Kombination IMI + AMPT ändert an diesem Ergebnis nichts. Dies steht jedoch in völligem Gegensatz zu den Untersuchungen von Friedman et al..
Während jene Autoren einen deutlichen Anstieg des NA-Spiegels

(entsprechend einer Hemmung der Aufnahme von AMPT in das präsynaptische Axon durch IMI(DMI)) beobachten, kann DMI(IMI) in den vorliegenden Untersuchungen die NA-Synthese-Hemmung durch AMPT nicht verhindern. Eine befriedigende Erklärung für diese Diskrepanz ist nicht sichtbar.

RES, das die Speicher von Na, DA und Serotonin entleert, führt zu einer - an Tag 6 signifikanten - Supersensitivität noradrenerger Rezeptoren. Dies steht in Übereinstimmung mit (81-83).

IMI scheint in der Kombination mit RES - im Gegensatz zur Kombination mit AMPT - die Aufnahme von RES in das präsynaptische Neuron teilweise verhindern zu können :
Die Folge ist ein deutlicher Anstieg des NA-Spiegels bzw. Subsensitivität postsynaptischer noradrenerger Rezeptoren, die jedoch nach 9 Tagen IMI-Applikation nicht zu beobachten ist.
Deutlich treten hier die gegenläufigen Effekte nach Gabe von DMI(IMI) oder Reserpin zutage :

DMI führt primär durch die Rückaufnahme-Hemmung von NA zu einem Absinken der intraneuronalen NA-Konzentration, letzten Endes jedoch durch die hohen synaptischen Transmitter-Spiegel zu einer Subsensitivität postsynaptischer noradrenerger Rezeptoren.

RES führt primär zu einer Verarmung des präsynaptischen Neurons an NA (DA, Serotonin). Sekundär infolge Verarmung des synaptischen Spaltes an NA zu supersensitiven postsynaptischen noradrenergen Rezeptoren.

Das entscheidende Kriterium ist die wirksame Transmitter-Konzentration am postsynaptischen Rezeptor :

hohe Konzentration über längere Zeit ⟶ Subsensitivität
niedere " " " " ⟶ Supersensitivität

Turnover-Messungen physiologisch wichtiger Stoffe sind für die Beurteilung des Einflusses von Pharmaka in vielen Fällen aufschlußreicher als Bestimmungen von „steady-state"-Spiegeln dieser Substanzen.
Jedoch sind die bisher veröffentlichten Untersuchungen des NA-turnover nach Gabe von IMI - je nach Bestimmungsmethode - widersprüchlich.
So berichten Corrodi und Fuxe (84), daß DMI vor allem die Umsatzrate von NA beeinträchtigt, während IMI vorzugsweise den Serotonin-turnover blockiert. Schildkraut et al. (72) berichten dagegen von einem leichten Anstieg des NA-turnover nach chronischer Gabe von IMI(DMI).

Der Hypothese einer unmittelbaren antidepressiven Wirkung von DMI(IMI) widersprechen die Tatsachen, daß

1. die antidepressive Wirkung beim Menschen erst nach Gabe von DMI(IMI) über einen Zeitraum von mindestens etwa 1 - 2 Wochen auftritt und
2. weitgehend synchron dazu die Stimulierbarkeit noradrenerger Rezeptoren in der Cortex nach Vorbehandlung mit IMI signifikant reduziert ist.

So könnte der Wirkungsmechanismus von IMI(DMI) wie folgt ablaufen :

1. Nach oraler Gabe von IMI ist wenige Stunden später beinahe ausschließlich nur noch der Hauptmetabolit DMI im Gehirn anwesend.
2. Die Rückaufnahme von NA (und anderer Transmitter ?) wird sofort gehemmt. Dieser Effekt ist apparent, solange DMI im Gehirn ist.
3. Die in der Folge im synaptischen Spalt entstehenden hohen Transmitter-Konzentrationen führen nach etwa 6 - 10 Tagen zu einer Subsensitivität noradrenerger Rezeptoren. Die verminderte Stimulierbarkeit scheint auf einer Verminderung der Zahl oder Konformationsänderung NA-sensitiver Rezeptoren zu beruhen.

Messungen der Proteinbiosynthese während und nach Applikation von IMI(DMI) sowie weitere Bindungsstudien mit spezifischen ß-(Ant)agonisten wären geeignet, letztere Hypothese weiter zu erhärten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Männliche Ratten wurden bis zu 9 Tage mit IMI-HCl (30-50 mg/kg/Tag) vorbehandelt. Zu mehreren Zeitpunkten während und bis zu 6 Tage nach Behandlung wurden Tiere durch Decapitation getötet und nach Präparation von Gehirnschnitten von Cortex, Cerebellum und Striatum verschiedene Untersuchungen zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus von IMI durchgeführt.

1. Dosis-Wirkungs-Kurven mit Schnitten von Cortex und Cerebellum nach 9-tägiger IMI-Vorbehandlung zeigten unterschiedliche Ergebnisse :
   Die Stimulierbarkeit noradrenerger Rezeptoren in der Cortex ist nach längerer IMI-Vorbehandlung - wie gefunden (20, 21) - signifikant vermindert. Dies deutet auf eine nicht-kompetitive Hemmung postsynaptischer noradrenerger Rezeptoren hin. Der Befund wird im Hinblick auf eine - diesem Ergebnis nicht widersprechende, bereits gefundene (75,76) - Verminderung NA-sensitiver postsynaptischer Rezeptoren diskutiert.
   Im Cerebellum konnte keine Subsensitivität noradrenerger Rezeptoren gefunden werden. Dies widerspricht nicht unbedingt den Ergebnissen von Siggins und Schultz (77), da diese eine sehr spezifische Technik für ihre Unter-

suchungen anwenden.
Im Striatum trat ebenfalls keine Subsensitivität dopaminerger und noradrenerger Rezeptoren auf. Mehrere Anhaltspunkte deuten auf - im Vergleich zu Cortex und Cerebellum - erheblich verringerte DMI(IMI)-„steady-state"-Spiegel hin.

2. Die in der Cortex nach Vorbehandlung mit IMI subsensitiv gewordenen noradrenergen Rezeptoren sind nach Absetzen der Droge innerhalb von 4 Tagen wieder normal stimulierbar. Eine Gabe des Proteinbiosynthese-Inhibitors Chloramphenicol hat keinen Einfluß auf die Reversibilität. Dies deutet auf eine Konformationsänderung noradrenerger Rezeptoren bei längerer IMI-Gabe.

3. Nach oraler Applikation von IMI ist - in Bestätigung der Untersuchungen von Nagy (57) - spätestens nach 24 h (fast) nur noch DMI im Gehirn der Ratte vorhanden. Nach mehrmaliger IMI-Gabe (30 mg/kg/Tag) stellt sich ein „steady-state"-Spiegel von 2 - 3 µg DMI/g bzw. etwa 0,6 µg IMI/g Gewebe ein.
Eine 60 min-Inkubation bewirkt eine erhebliche Verringerung (-37 bis -80 %) dieser Spiegel.

4. Die in Cortex, Cerebellum und Striatum gemessene Rückaufnahme von NA (Striatum: + DA) zeigt folgendes :
Die Hemmung der NA-Rückaufnahme in der Cortex ist vom DMI-Spiegel unmittelbar abhängig : 2 Tage nach Absetzen

der Droge (IMI) ist keine Hemmung mehr nachweisbar ; dieser Effekt ist synchron zur Elimination von DMI aus der Cortex.
Dies wurde auch im Cerebellum gefunden. Hier scheint jedoch die Eliminationsgeschwindigkeit von DMI - im Vergleich zur Cortex - verringert zu sein.
Die Untersuchungen der NA-Rückaufnahme in Abhängigkeit der in vitro-IMI-Konzentration machten weiter deutlich, daß die in vivo-IMI(DMI)-Konzentrationen am Wirkort d.h. an der präsynaptischen Membran noch geringer sind als die nach 60 min Inkubation gefundenen. Dies würde eine unterschiedliche inter(intra)neuronale Verteilung bzw. Kompartimentierung von DMI(IMI) bedeuten.
Im Striatum war die Rückaufnahmegeschwindigkeit von DA und NA nach Vorbehandlung mit IMI von der in vitro-Anwesenheit von IMI abhängig : Ohne 10^{-6} M IMI war keine Hemmung zu erkennen. Mit 10^{-6} M IMI war die Hemmung - zumindest bei DA, in Bestätigung von (78,79) - signifikant.
Dies unterstützt die in 1. angeführte Hypothese eines erheblich verringerten DMI(IMI)-Spiegels im Striatum.
Die Rückaufnahme von NA in der Cortex wird durch IMI wahrscheinlich nicht-kompetitiv gehemmt.

5. Die spontane motorische Aktivität wird durch längere Gabe von Imipramin leicht gedämpft.

6. Die Untersuchungen zur NA-stimulierten cAMP-Bildung und der Katecholamin-Spiegel nach Vorbehandlung mit IMI, AMPT,

RES, IMI + AMPT, IMI + RES lassen keine eindeutigen Rückschlüsse zu, da unsere Ergebnisse mit denen von veröffentlichten Untersuchungen z.T. nicht übereinstimmen.

7. Ein Denk-Modell zum Wirkungsmechanismus von IMI(DMI) im Gehirn - z.T. auf eigenen Untersuchungen beruhend - wird vorgeschlagen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Thiele, J., Holzinger, O.,
   Justus Liebigs Ann. Chem. 305, 96 (1899)
2. Patterson, A.M., Capell, L.T.,
   Ring Indéx No. 2064, 279 (1940)
3. Kuhn, R.,
   Schweiz. med. Wschr. 87, 1135 (1957)
4. Kuhn, R.,
   Second Annual Taylor Manor Hospital Scientific Symposium :
   „Discoveries in Biological Psychiatry" Baltimore (19.4.1970)
5. Domenjoz, R., Theobald, W.,
   Arch. int. Pharmacodyn. 120, 450 (1959)
6. Sigg, E.B.,
   Canad. psychiat. Ass. J. 4(Spec. Suppl.), 75 (1959)
7. Schaeppi, U.,
   Helv. physiol. pharmacol. Acta 18, 545 (1960)
8. Axelrod, J., Hertting, G., Potter, L.,
   Nature (London) 194, 297 (1962)
9. Axelrod, J., Whitby, L.G., Hertting, G.,
   Science 133, 383 (1961)
10. Iversen, L.L.,
    J. Pharm. Pharmacol. 17, 62 (1965)
11. Glowinski, J., Axelrod, J.,
    Nature (London) 204, 1318 (1964)
12. Carlsson, A., Fuxe, K., Ungerstedt, U.,
    J. Pharm. Pharmacol. 20, 150 (1968)
13. Fuxe, K., Ungerstedt, U.,
    Europ. J. Pharmacol. 4, 135 (1968)
14. Schildkraut, J.J., Gordon, E.K., Durell, J.,
    J. psychiat. Res. 3, 213 (1965)

15. Schildkraut, J.J.,
Amer. J. Psychiat. 122, 509 (1965)
16. Schildkraut, J.J.,
Int. J. Psychiat. 4, 203 (1967)
17. Brodie, B.B., Sulser, F., Costa, E.,
Int. Symp., Montreal 1960, 183 (Ed. psychiat., Montreal 1961)
18. Brodie, B.B.,
Symp., London 1964, 127 (Pergamon Press, Oxford 1965)
19. Sutherland, E.W., Rall, T.W., Menon, T.,
J. Biol. Chem. 237, 1220 (1962)
20. Vetulani, J., Stawarz, R.J., Dingell, J.V., Sulser, F.,
Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 293, 109 (1976)
21. Schultz, J.E.,
Nature 261, 417 (1976)
22. Ferreira, T.A., Mendes, J.F.,
Act. luso-esp. Neurol. 25, 13 (1966)
23. Bray, G.A.,
Analyt. Biochem. 1, 279 (1960)
24. Roffler-Tarlov, S.,
Biochem. Pharmacol. 24, 1321 (1975)
25. Glowinski, J., Iversen, L.L.,
J. Neurochem. 13, 655 (1966)
26. Forn, J., Krueger, B.K., Greengard, P.,
Science 186, 1118 (1974)
27. Gilman, A.G.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67,1, 305 (1970)
28. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R.,
Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G.,
Z. Naturf. 8b, 555 (1953)
29. Jacobs, E.E., Jacob, E., Sanadi, D.R., Bradley, L.B.,
J. Biol. Chem. 223, 147 (1956)
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
31. Andrae, U.,
Diplomarbeit, Tübingen (1976)

32. Miyamoto, E., Kuo, J.F., Greengard, P.,
J. Biol. Chem. 244,23, 6395 (1969)
33. Warburg, O., Christian, W.,
Biochem. Z. 310, 384 (1941)
34. Brodie, B.B., Bickel, M.H., Sulser, F.,
Med. Exp. (Basel) 5, 454 (1961)
35. Gillette, J.R., Dingell, J.V., Sulser, F.,
Kuntzmann, K., Brodie, B.B.,
Experientia (Basel) 17, 417 (1961)
36. Bickel, M.H., Weder, H.J.,
Arch. Int. Pharmacodyn. 173,2, 433 (1968)
37. Dingell, J.V., Sulser, F., Gillette, J.R.,
J. Pharmacol. Exp. Ther. 143, 14 (1964)
38. Craig, L.C.,
J. Biol. Chem. 155, 519 (1944)
39. Breiter, J., Helger, R., Lang, H.,
Forensic Science 7, 131 (1976)
40. Breyer-Pfaff, U., Spribille, Th., Jahns, I.,
Biochem. Pharmacol. 27, 1521 (1978)
41. Breyer, U., Schmalzing, G.,
Drug Metabolism and Disposition 5,2, 97 (1977)
42. Chang, C.C.,
Int. J. Neuropharmacol. 3, 643 (1964)
43. Crout, R.J.,
Standard Methods of Clinical Chem. Acad. Press N.Y.
3, 62 (1961)
44. Laverty, R., Taylor, K.M.,
Analytical Biochem. 22, 269 (1968)
45. Siggins, G.R., Oliver, A.P., Hoffer, B.J., Bloom, F.E.,
Science 171, 192 (1971)
46. Bloom, F.E.,
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 74, 1 (1975)
47. Kebabian, J.W., Petzold, G.L., Greengard, P.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2145 (1972)

48. Horn, A.S., Cuello, A.C., Miller, R.J.,
J. Neurochem. 22, 265 (1974)
49. Tang, L.C., Cotzias, G.C., Dunn, M.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71,9, 3350 (1974)
50. Haydu, G.G., Quinn, G.P.,
Proc. 4th World Congr. Psychiat., Madrid 1966, Int. Congr.
Ser. No. 150, 1875 (Excerpta Medica Found., Amsterdam 1968)
51. Schanker, L.S., Hogben, C.A.M.,
J. Pharmacol. Exp. Ther. 123, 81 (1968)
52. Moody, J.P., Tait, A.C., Todrick, A.,
Brit. J. Psychiat. 113, 183 (1967)
53. Michaelis, W., Stille, G.,
Life Sci. 7, 99 (1968)
54. Schneider, G. und G.,
Germ. med. Mth. 11, 543 (1968)
55. Herrmann, B.,
Arzneimittel-Forsch. 14, 219 (1964)
56. Van Wijk, M., Meisch, J.-J., Korf, J.,
Psychopharmacol. 55, 217 (1977)
57. Nagy, A.,
J. Pharm. Pharmac. 29, 104 (1977)
58. Ross, S.R., Renyi, A.L.,
Acta Pharmacol. Toxikol. 36, 382 (1975)
59. Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S.,
J. biol. Chem. 239, 2910 (1964)
60. Skolnick, Ph., Daly, J.W.,
Science 184, 175 (1974)
61. Segal, D.S., Kuczenski, R., Mandell, A.J.,
Biol. Psychiat. 9, 147 (1974)
62. Leonard, B.E., Kafoe, W.F.,
J. Pharmacol. Paris 5, Suppl. 2, 59 (1974)
63. Brodie, B.B., Spector, S., Shore, P.A.,
Pharmacol. Rev. 7, 548 (1959)
64. Nybäck, H.,
M.D. Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm, 13 (1971)

65. Spector, S., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S.,
J. Pharmacol. Exp. Ther. 147, 86 (1965)
66. Moore, K.E.,
Pharmacologist 7, 170 (1965)
67. Hanson, L.C.,
Psychopharmacologia 8, 100 (1965)
68. Friedman, E., Shopsin, B., Goldstein, M., Gershon, S.,
J. Pharm. Pharmac. Communications 26, 995 (1974)
69. Carlsson, A.,
Neuropsychopharmacol. 2, 417 (1961)
70. Holzbauer, M., Vogt, M.,
J. Neurochem. 1, 8 (1956)
71. Garattini, S., Giachetti, A., Jori, A., Pieri, L.,
Valzelli, L.,
J. Pharm. Pharmacol. 14, 509 (1962)
72. Schildkraut, J.J., Roffman, M., Orsulak, P.J.,
Schatzberg, A.F., Kling, M.A., Reigle, Th.G.,
Pharmakopsych. 9, 193 (1976)
73. Rosloff, B.N., Davis, J.M.,
Psychopharmacol. 40, 53 (1974)
74. Türck, M.,
Persönliche Mitteilung, Tübingen (1978)
75. Mukherjee, C., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1945 (1975)
76. Banerjee, S.P., Kung, L.S.,
Nature 268, 455 (1977)
77. Siggins, G.R., Schultz, J.E.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA , im Druck (1979)
78. Hyttel, J.,
Psychopharmacol. 51, 225 (1977)
79. Halaris, A.E., Belendiuk, K.T., Freedman, D.X.,
Biochem. Pharmacol. 24, 1896 (1975)
80. Fuxe, K., Ungerstedt, U.,
European J. Pharmacol. 4, 135 (1968)

81. Kalisker, A., Rutledge, C.D., Perkins, J.P.,
Molec. Pharmacol. 9, 619 (1973)
82. Huang, M., Ho, A.K.S., Daly, J.W.,
Molec. Pharmacol. 9, 711 (1973)
83. Dismukes, K., Daly, J.W.,
Molec. Pharmacol. 10, 933 (1974)
84. Corrodi, H., Fuxe, K.,
European J. Pharmacol. 7, 56 (1969)

L e b e n s l a u f

Am 30. Januar 1949 wurde ich als drittes Kind des Schreinermeisters Adam Schocker und seiner Ehefrau Franziska geb. Leonhard in Tettnang geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Kehlen und anschließend bis zur Mittleren Reife das Progymnasium Tettnang.

Nach dem Wechsel auf das Neue Gymnasium Ravensburg legte ich im Juli 1967 das Abitur ab.

Von Oktober 1967 bis März 1969 leistete ich den Grundwehrdienst ab.

Am 1. April 1969 begann ich die Ausbildung zum Apotheker mit dem Praktikum in der Apotheke am Goetheplatz in Ravensburg, das ich im März 1971 mit der Pharmazeutischen Vorprüfung abschloß.

Bis zur Zulassung zum Pharmaziestudium im WS 1971/72 an der Universität Tübingen studierte ich ein Semester Humanmedizin an der Universität Hohenheim.

Im März 1975 legte ich die Pharmazeutische Prüfung ab.

Im Juli 1975 begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz am Institut für Toxikologie und am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen mit der vorliegenden Dissertation, die ich im SS 1979 abschloß.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren :

Pharmazeutische Biologie	E. Reinhard
Pharmazeutische Chemie	H. Auterhoff
	K.-A. Kovar
	H.R. Maurer
	F. Moll
Pharmazeutische Technologie	E. Graf
	H. Hamacher
Pharmakologie	H.P.T. Ammon
Anorganische Chemie	W. Rüdorff
Organische Chemie	E. Bayer
	E. Müller
Physik	K. Krüger
Hygiene	R.E. Bader